

**Pflanzliche Polyketidsynthesen des Typ III**  
**in *Wachendorfia thyrsiflora* (Haemodoraceae)**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl. Biochemikerin Silke Brand  
geboren am 05.05.1978 in Altenburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ludger Beerhues
2. Prof. Dr. Ulrich Pommer
3. PD Dr. Bernd Schneider

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2005

Tag der öffentlichen Verteidigung: 23.06.2005

## **Inhaltsverzeichnis**

|  |               |
|--|---------------|
| <b>1. Einleitung</b>   | <b>I</b>      |
| <b>1.1 Allgemeine Einführung</b>   | <b>- 1 -</b>  |
| <b>1.2 <i>Wachendorfia thyrsiflora</i> – ein Vertreter der Haemodoraceae</b> | <b>- 2 -</b>  |
| 1.2.1 Systematik, Verbreitung und Nutzen der Haemodoraceae                   | - 2 -         |
| 1.2.2 Das Untersuchungsobjekt <i>Wachendorfia thyrsiflora</i>                | - 3 -         |
| <b>1.3 Phenylphenalenone</b>   | <b>- 5 -</b>  |
| 1.3.1 Strukturelle Diversität, Vorkommen und Bedeutung der Phenylphenalenone | - 5 -         |
| 1.3.2 Der Forschungsstand zur Biosynthese der Phenylphenalenone              | - 6 -         |
| <b>1.4 Diarylheptanoide als Intermediate der Phenylphenalenonbiosynthese</b> | <b>- 9 -</b>  |
| 1.4.1 Vorkommen, Strukturen und Bedeutung der Diarylheptanoide               | - 9 -         |
| 1.4.1.1 Vorkommen und Bedeutung der Diarylheptanoide                         | - 9 -         |
| 1.4.1.2 Lineare Diarylheptanoide   | - 10 -        |
| 1.4.1.3 Diarylheptanoide mit zyklisierter C <sub>7</sub> -Kette              | - 11 -        |
| 1.4.1.4 Makrozyklische Diarylheptanoide und Diaryletherheptanoide            | - 11 -        |
| 1.4.1.5 Komplexe Diarylheptanoide  | - 11 -        |
| 1.4.2 Forschungsstand der Biosynthese der Diarylheptanoide                   | - 12 -        |
| <b>1.5 Polyketidsynthasen</b>  | <b>- 13 -</b> |
| 1.5.1 Allgemeine Bemerkungen zu Polyketidsynthasen                           | - 13 -        |
| 1.5.2 Struktur und Mechanismus der Polyketidsynthasen vom Typ III            | - 14 -        |
| 1.5.3 Beispiele für Polyketidsynthasen                                       | - 15 -        |
| 1.5.3.1 Chalconsynthase  | - 15 -        |
| 1.5.3.2 Stilbensynthase  | - 16 -        |
| 1.5.3.3 Weitere Polyketidsynthasen   | - 18 -        |
| <b>1.6 Zielstellung</b>  | <b>- 20 -</b> |
| <b>2. Material und Methoden</b>  | <b>- 22 -</b> |
| <b>2.1 Material und Geräte</b>   | <b>- 22 -</b> |
| <b>2.2 Chemische Synthese</b>  | <b>- 23 -</b> |
| 2.2.1 Coenzym A-Derivate   | - 23 -        |
| 2.2.1.1 Synthese von Succinimidestern am Beispiel von Ferulasäure-Succinimid | - 23 -        |
| 2.2.1.2 Synthese von Coenzym A-Derivaten am Beispiel von Cinnamoyl-CoA       | - 23 -        |
| 2.2.2 Diketid-N-Acetylcysteamin (NAC)-Derivate                               | - 23 -        |
| 2.2.3 Diarylheptanoid-Synthese   | - 25 -        |
| 2.2.3.1 (4E)-1,7-Diphenyl-hept-4-en-3-on                                     | - 25 -        |
| 2.2.3.2 (4E,6E)-1,7-Diphenyl-hept-4,6-dien-3-on                              | - 25 -        |
| 2.2.3.3 (4E,6E)-3-Hydroxy-1,7-diphenyl-hepta-4,6-dien                        | - 25 -        |
| 2.2.3.4 5-Hydroxy-1,7-diphenyl-heptan-3-on                                   | - 26 -        |
| 2.2.3.5 3,5-Diketo-1,7-diphenyl-heptan                                       | - 26 -        |
| <b>2.3 Trennmethoden</b>   | <b>- 26 -</b> |
| 2.3.1 Chromatographische Trennungen  | - 26 -        |
| 2.3.1.1 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)                     | - 26 -        |
| 2.3.1.2 Dünnschichtchromatographie (DC)                                      | - 27 -        |
| 2.3.1.3 Säulenchromatographie (SC)   | - 27 -        |
| 2.3.2 Elektrophoresen  | - 27 -        |
| 2.3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese                                  | - 27 -        |
| 2.3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA                                    | - 28 -        |
| 2.3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese von RNA                                    | - 29 -        |
| <b>2.4 Kultivierung von <i>Wachendorfia thyrsiflora</i>-Wurzelkulturen</b>   | <b>- 29 -</b> |
| <b>2.5 Molekularbiologische Methoden</b>                                     | <b>- 30 -</b> |
| 2.5.1 Isolierung von Ribonukleinsäuren                                       | - 30 -        |
| 2.5.1.1 Herstellung von DEPC-Wasser  | - 30 -        |

|  |               |
|--|---------------|
| 2.5.1.2 RNA-Isolierung.....  | - 30 -        |
| 2.5.1.3 Bestimmung der RNA -Konzentration und -Reinheit.....                             | - 31 -        |
| 2.5.2 Synthese von cDNA .....  | - 31 -        |
| 2.5.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....   | - 31 -        |
| 2.5.4 5'/3'-RACE .....   | - 32 -        |
| 2.5.5 Reinigungsmethoden für DNA.....  | - 32 -        |
| 2.5.6 Klonierungsverfahren.....  | - 33 -        |
| 2.5.6.1 Plasmide .....   | - 33 -        |
| 2.5.6.2 Stämme .....   | - 33 -        |
| 2.5.6.3 Medien.....  | - 33 -        |
| 2.5.6.4 TOPO-TA-Cloning®.....  | - 34 -        |
| 2.5.6.5 Klonierung in den Expressionsvektor pHis8.....                                   | - 34 -        |
| 2.5.7 Restriktionsanalysen.....  | - 35 -        |
| 2.5.8 Minipräparationen.....   | - 35 -        |
| 2.5.9 Phagenbibliothek.....  | - 36 -        |
| 2.5.9.1 Stämme .....   | - 36 -        |
| 2.5.9.2 Medien.....  | - 36 -        |
| 2.5.9.3 Puffer .....   | - 37 -        |
| 2.5.9.4 Amplifikation der Primärbank.....  | - 37 -        |
| 2.5.9.5 Untersuchung („Screening“) der cDNA-Bank.....                                    | - 38 -        |
| 2.5.9.6 Freisetzung („in vivo excision“) des Plasmids.....                               | - 39 -        |
| 2.5.10 Sequenzierung .....   | - 39 -        |
| 2.5.11 Mutagenese.....   | - 39 -        |
| <b>2.6 Biochemische Methoden.....</b>  | <b>- 40 -</b> |
| 2.6.1 Proteinexpression.....   | - 40 -        |
| 2.6.2 Zellaufschluss .....   | - 40 -        |
| 2.6.3 Reinigung der Proteine durch Metallchelatchromatographie.....                      | - 41 -        |
| 2.6.4 Gelfiltration.....   | - 41 -        |
| 2.6.5 Bestimmung der Proteinkonzentration und -reinheit .....                            | - 41 -        |
| 2.6.6 Messung von Enzymaktivitäten.....  | - 42 -        |
| <b>2.7 Nachweismethoden.....</b>   | <b>- 42 -</b> |
| 2.7.1 Kernmagnetische Resonanz (NMR)-Spektroskopie.....                                  | - 42 -        |
| 2.7.1.1 Spektrometer, Probenköpfe, Peripheriegeräte.....                                 | - 42 -        |
| 2.7.1.2 Lösungsmittel und Referenzierung .....   | - 43 -        |
| 2.7.1.3 NMR-Methoden.....  | - 43 -        |
| 2.7.2 Massenspektrometrie .....  | - 43 -        |
| 2.7.2.1 Massenspektren von Syntheseprodukten .....                                       | - 43 -        |
| 2.7.2.2 Massenspektren von Enzymprodukten .....  | - 43 -        |
| 2.7.2.3 Massenspektren von Proteinfragmenten.....  | - 44 -        |
| <b>2.8 Computerprogramme .....</b>   | <b>- 45 -</b> |
| <b>3. Ergebnisse.....</b>  | <b>- 46 -</b> |
| <b>3.1 Voraussetzungen für diese Arbeit .....</b>  | <b>- 46 -</b> |
| 3.1.1 Grundlage dieser Arbeit .....  | - 46 -        |
| 3.1.2 Synthese.....  | - 46 -        |
| 3.1.2.1 Coenzym A-Derivate.....  | - 46 -        |
| 3.1.2.2 Diketid-N-Acetylcysteamin -Derivate .....  | - 47 -        |
| 3.1.2.3 Diarylheptanoide.....  | - 48 -        |
| 3.1.3 Auswahl der Pflanze .....  | - 50 -        |
| <b>3.2 Die Untersuchung des Enzyms Wdf1 .....</b>  | <b>- 51 -</b> |
| 3.2.1 Das Gen <i>wdf1</i> in nichtinduzierter Kultur.....                                | - 51 -        |
| 3.2.2 Die Expression des Proteins Wdf1.....  | - 53 -        |
| 3.2.3 Enzymatische Aktivität des Proteins Wdf1.....                                      | - 55 -        |
| 3.2.3.1 Abhängigkeit der Enzymaktivität von Wdf1 von der Temperatur und dem pH-Wert..... | - 55 -        |
| 3.2.3.2 Substratspezifität des Enzyms Wdf1 .....   | - 57 -        |
| 3.2.3.3 Bestimmung der Enzymprodukte.....  | - 59 -        |
| 3.2.3.4 Enzymkinetische Konstanten des Enzyms Wdf1.....                                  | - 65 -        |

|   |              |
|---|--------------|
| <b>3.3 Das Enzym Wdf2</b> .....   | <b>68 -</b>  |
| 3.3.1 Das Gen <i>wdf2</i> .....   | 68 -         |
| 3.3.2 Die Expression des Proteins Wdf2.....   | 68 -         |
| 3.3.3 Enzymatische Aktivität des Proteins Wdf2.....   | 69 -         |
| <b>3.4 Das Enzym Wdf3</b> .....   | <b>70 -</b>  |
| 3.4.1 Das Gen <i>wdf3</i> in einer cDNA-Bank.....   | 70 -         |
| 3.4.2 Die Expression des Proteins Wdf3.....   | 71 -         |
| 3.4.3 Enzymatische Aktivität des Proteins Wdf3.....   | 72 -         |
| <b>3.5 Vergleich der Typ III-Polyketidsynthasen aus <i>Wachendorfia thyrsiflora</i></b> .....           | <b>74 -</b>  |
| 3.5.1 Vergleich der drei gefundenen Proteine mit anderen Typ III- Polyketidsynthasen.....               | 74 -         |
| 3.5.2 Vergleich von Wdf2 und Wdf3.....  | 78 -         |
| <b>4. Diskussion</b> .....  | <b>80 -</b>  |
| <b>4.1 Allgemeine Vorbemerkungen</b> .....  | <b>80 -</b>  |
| <b>4.2 Funktion der Typ III-Polyketidsynthasen in <i>Wachendorfia thyrsiflora</i></b> .....             | <b>81 -</b>  |
| 4.2.1 Begriffsklärung.....  | 81 -         |
| 4.2.2 Das Enzym Wdf1.....   | 82 -         |
| 4.2.3 Das Enzym Wdf2.....   | 86 -         |
| 4.2.4 Das Enzym Wdf3.....   | 87 -         |
| <b>4.3 Das Enzym für den zweiten Kondensationsschritt</b> .....   | <b>89 -</b>  |
| <b>4.4 Untersuchungen zur Struktur der Polyketidsynthasen aus <i>Wachendorfia thyrsiflora</i></b> ..... | <b>91 -</b>  |
| <b>4.5 Lösungsansätze zur Aufklärung des zweiten Kondensationsschrittes</b> .....                       | <b>96 -</b>  |
| <b>5. Zusammenfassung</b> .....   | <b>99 -</b>  |
| <b>6. Literaturverzeichnis</b> .....  | <b>102 -</b> |
| <b>Anhang</b> .....   | <b>108 -</b> |
| <b>A1: Analytische Daten der Synthesen</b> .....  | <b>108 -</b> |
| A1.1 Succinimid-Ester-Synthese.....   | 108 -        |
| A1.2 Coenzym A (CoA)-Ester-Synthese.....  | 109 -        |
| A1.3 Diketid-N-Acetylcysteamin (NAC)-Derivate .....   | 109 -        |
| A1.4 Diarylheptanoide .....   | 110 -        |
| <b>A2: Verwendete Primer</b> .....  | <b>112 -</b> |
| <b>A3: mRNA-Sequenzen der PKS-Gene aus <i>Wachendorfia thyrsiflora</i></b> .....                        | <b>113 -</b> |
| <b>A4: Massenspektrometrisch nachgewiesene Proteinsequenzen</b> .....                                   | <b>115 -</b> |

## Abkürzungen

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| 2PS                           | 2-Pyronsynthase   |
| 4CL                           | <i>p</i> -Cumarsäure-CoA-Ligase   |
| [A]                           | Substratkonzentration   |
| A.                            | <i>Anigozanthos</i>   |
| ACS                           | Acridonsynthase   |
| ALS                           | Aloesonsynthase   |
| APS                           | Ammoniumpersulfat   |
| APT                           | Attached proton test  |
| BAS                           | Benzalacetonsynthase  |
| BBS                           | Bibenzylsynthase  |
| Bis-Tris                      | Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan                      |
| β-ME                          | β-Mercaptoethanol   |
| bp                            | Basenpaar   |
| BPS                           | Benzophenonsynthase   |
| brs                           | Breites Singulett   |
| C4H                           | <i>trans</i> -Cinnamate-4-Monooxygenase                                     |
| CDCl <sub>3</sub>             | Deuteriertes Chloroform   |
| cDNA                          | Zur mRNA komplementäres DNA-Molekül   |
| CHS                           | Chalconsynthase   |
| CoA                           | Coenzym A   |
| COSY                          | Correlated spectroscopy   |
| cts                           | Zahl der pro Sekunde gemessenen Lichtquanten (in der Scintillationsmessung) |
| d                             | Dublett   |
| Da                            | Dalton  |
| DAD                           | Diode-array detector  |
| DBU                           | 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en   |
| DC                            | Dünnschichtchromatographie  |
| DCC                           | N, N'-Dicyclohexylcarbodiimid   |
| dd                            | Doppeltes Dublett   |
| ddd                           | Dreifaches Dublett  |
| DEPC                          | Diethylpyrocarbonat   |
| DEPT                          | Distortionless enhancement by polarization transfer                         |
| DMAP                          | Dimethylaminopyridin  |
| DMF                           | Dimethylformamid  |
| DMSO                          | Dimethylsulfoxid  |
| DNA                           | Desoxyribonukleic acid  |
| DNase                         | Desoxyribonuklease  |
| dNTP                          | Desoxynukleotidtriphosphat  |
| dpm                           | Zerfälle pro Minute   |
| dt                            | Doppeltes Triplett  |
| d.Th.                         | Der Theorie   |
| DTT                           | Dithiothreitol  |
| [E]                           | Enzymkonzentration  |
| EC                            | Enzymkommission   |
| <i>E. coli</i>                | <i>Escherichia coli</i>   |
| EDTA                          | Ethylendiamintetraessigsäure  |
| EI-MS                         | Electron impact mass spectrometry   |
| ESI                           | Electrospray ionisation   |
| EtOH                          | Ethanol   |
| eV                            | Elektronenvolt  |
| gHMBC                         | Gradient-assisted heteronuclear bond correlation                            |
| gHMQC                         | Gradient-assisted heteronuclear multiple quantum coherence                  |
| HEPES                         | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure                             |
| HPLC                          | High performance liquid chromatography                                      |
| HSCoA                         | Freies Coenzym A  |
| HDO                           | Teilweise deuteriertes Wasser   |
| IPTG                          | Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid  |
| <i>J</i>                      | Kopplungskonstante  |
| $k_{\text{kat}}$              | Wechselzahl   |
| $K_{\text{m}}$                | Michaelis-Konstante   |
| $k_{\text{kat}}/K_{\text{m}}$ | Katalytische Effizienz  |

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| LB                              | Lucia-Bertani-Medium  |
| LDA                             | Lithium-diisopropylamid   |
| lrCOSY                          | Long range correlated spectroscopy                                |
| <i>m</i> -                      | <i>meta</i> -   |
| M <sup>+</sup> , M <sup>-</sup> | Molekulation (positiv oder negativ geladen)                       |
| MALDI                           | Matrix assisted laser desorption ionisation                       |
| MeCN                            | Acetonitril   |
| MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub>     | Deutiertes Methanol   |
| MeOH                            | Methanol  |
| MOPS                            | Morpholino-propansulfonsäure                                      |
| mRNA                            | Boten-RNA   |
| MS                              | Massenspektrometrie, Murashige/Skoog (bei Medien)                 |
| <i>m/z</i>                      | Quotient aus Masse und Ladung (in der Massenspektrometrie)        |
| NAA                             | α-Naphthalene acetic acid   |
| NAC                             | N-Acetylcysteamin   |
| NADPH                           | Nikotinamid -adenin -dinukleotid-phosphat                         |
| NH <sub>4</sub> Ac              | Natriumacetat   |
| NMR                             | Nuclear magnetic resonance  |
| <i>o</i> -                      | <i>ortho</i> -  |
| OD <sub>xxx</sub>               | Optische Dichte bei xxx nm  |
| OLS                             | Olivetolsynthese  |
| <i>p</i> -                      | <i>para</i> -   |
| PAL                             | Phenylalanin-Ammonium-Lyase                                       |
| PCR                             | Polymerase chain reaction   |
| PDC                             | Pyridindichromat  |
| pfu                             | Plaque forming unit   |
| pK <sub>B</sub>                 | Negativer dekadischer Logarithmus der Basenkonstante              |
| PKS                             | Polyketidsynthese   |
| PIVPS                           | Phloroisovalerophenonsynthese                                     |
| PMSF                            | Phenylmethylsulfonylfluorid                                       |
| ppm                             | Parts per million   |
| PSC                             | Präparative Schichtchromatographie                                |
| RACE                            | Rapid amplification of cDNA ends                                  |
| RNA                             | Ribonucleic acid  |
| RNase                           | Ribonuklease  |
| rRNA                            | Ribosomale RNA  |
| RP                              | Reversed phase  |
| rpm                             | Umdrehungen pro Minute  |
| RT                              | Raumtemperatur  |
| R <sub>t</sub>                  | Retentionszeit  |
| δ                               | Chemische Verschiebung relativ zu TMS                             |
| s                               | Singulett   |
| SC                              | Säulenchromatographie   |
| SDS                             | Sodium dodecyl sulphate   |
| SPE                             | Solid phase extraction  |
| SPS                             | Styrylpyrrolsynthese  |
| STS                             | Stilbensynthese   |
| t                               | Triplett  |
| TAE                             | Tris -Acetat-EDTA-Puffer  |
| Taq                             | <i>Thermus aquaticus</i>  |
| TEMED                           | N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin                           |
| TFA                             | Trifluor acetic acid  |
| THF                             | Tetrahydrofuran   |
| TMS                             | Tetramethylsilan  |
| TOF                             | Time of flight  |
| Tris                            | Tris -(hydroxymethyl)-aminoethan                                  |
| U                               | Unit (Aktivitätseinheit von Enzymen)                              |
| UV                              | Ultraviolett  |
| V                               | Maximalgeschwindigkeit  |
| v                               | Geschwindigkeit   |
| VWD                             | Variable wavelength detector                                      |
| VPS                             | Valerophenonsynthese  |
| v/v                             | Volumen pro Volumeneinheit  |
| Wdf 1, Wdf2, Wdf3               | Polyketidsynthasen (Proteine) aus <i>Wachendorfia thyrsiflora</i> |

|   |   |
|---|---|
| <i>wdf1</i> , <i>wdf2</i> , <i>wdf3</i> | Gene der Polyketidsynthasen aus <i>Wachendorfia thyrsiflora</i> |
| w/v                                     | Gewicht pro Volumeneinheit                                      |
| X-Gal                                   | 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid                 |
| x g                                     | -fache Erdbeschleunigung  |

### Aminosäuren

|                |     |   |              |     |   |
|----------------|-----|---|--------------|-----|---|
| Alanin         | Ala | A | Leucin       | Leu | L |
| Asparagin      | Asn | N | Lysin        | Lys | K |
| Asparaginsäure | Asp | D | Methionin    | Met | M |
| Arginin        | Arg | R | Phenylalanin | Phe | F |
| Cystein        | Cys | C | Prolin       | Pro | P |
| Glutamin       | Gln | Q | Serin        | Ser | S |
| Glutaminsäure  | Glu | E | Threonin     | Thr | T |
| Glycin         | Gly | G | Tryptophan   | Trp | W |
| Histidin       | His | H | Tyrosin      | Tyr | Y |
| Isoleucin      | Ile | I | Valin        | Val | V |

### Nukleinsäuren

|         |   |
|---------|---|
| Adenin  | A |
| Cytosin | C |
| Guanin  | G |
| Thymin  | T |
| Uracil  | U |



## **1. Einleitung**

### **1.1 Allgemeine Einführung**

Schon seit dem Altertum werden viele Pflanzen in der Heilkunde verwendet, man denke dabei an die fiebersenkende Wirkung von Weidenrinde oder an die betäubenden, schmerzlindernden Eigenschaften von Mohn. Grund für diese vielfältigen Anwendungen sind zumeist so genannte sekundäre Naturstoffe. Dies sind Stoffe, die von Pflanzen und anderen Organismen gebildet werden, aber nicht unbedingt für Wachstum und Entwicklung der Zelle vonnöten sind. Sie haben vielmehr einen Nutzen für den Organismus z.B. die Pflanze als Ganzes. Die Funktionen, die diese Substanzen haben, sind ebenso vielfältig wie ihre Strukturen. Ein großer Teil von ihnen hilft der Pflanze bei der Abwehr von Schädlingen und dem Abbau von oxidativem Stress. Viele Pflanzen reagieren bei Infektion mit Krankheitserregern oder Bestrahlung mit UV-Licht mit der Induktion sekundärer Naturstoffe, wie z.B. Flavonoiden. Dadurch spielen diese Stoffe eine wichtige Rolle in den ökologischen Wechselwirkungen der Pflanze mit ihrer Umgebung. Die Forschung beschäftigt sich jedoch nicht nur mit der Aufklärung der Struktur und der ökologischen Funktion, sondern auch mit der Biosynthese dieser Substanzen. Diese kann wichtige Hinweise zur Evolution des Stoffwechselweges und damit der Pflanzenwelt geben. Damit lässt sich auch erklären, warum manche Pflanzen in der Lage sind, bestimmte Stoffe herzustellen und darum resistenter als andere gegenüber bestimmten Schädlingen sind. Schließlich ermöglicht nur das Wissen um die am Biosyntheseweg beteiligten Enzyme die Produktion gentechnisch veränderter Pflanzen mit höherer Resistenz und verbesserten Eigenschaften. Die heutzutage zur Verfügung stehenden molekularbiologischen Methoden ermöglichen die vergleichsweise einfache Isolierung großer Mengen auch von solchen Enzymen, die in der Pflanze nur in sehr geringer Menge gebildet werden. Damit erleichtert die moderne Molekularbiologie ganz wesentlich die Aufklärung von Biosynthesewegen.

Die hier vorgestellte Arbeit beschäftigt sich mit der Aufklärung des Anfangs eines Stoffwechselweges, der in bestimmten Pflanzen zu sogenannten Diarylheptanoiden führt. Diese Sekundärstoffe weisen eine große Vielfalt an ökologischen Funktionen auf (siehe 1.4.1). Pflanzen wie der Ingwer, die große Mengen dieser Stoffe enthalten, werden schon seit langer Zeit als Nahrungsmittel und Heilpflanzen in der traditionellen asiatischen Medizin eingesetzt. Spezielle Vertreter dieser Diarylheptanoide, die Phenylphenalenone, kommen nicht nur in (wirtschaftlich eher unbedeutenden) Pflanzen wie *Wachendorfia thyrsiflora*, sondern auch in den Bananen (Musaceae) vor. Diese Pflanzen sind ein wichtiges Grundnahrungsmittel in vielen Ländern der dritten Welt. Insbesondere die kultivierten Sorten leiden häufig unter

Befall mit Pilzen und anderen Krankheitserregern, der zu einem drastischen Ernteverlust führen kann. Daher ist bisher eine vielfache Behandlung mit Pflanzenschutzmitteln nötig. Für die Resistenz wilder Bananensorten wird die Induktion von Phenylphenalenonen mitverantwortlich gemacht. Die Aufklärung dieses Biosyntheseweges kann damit einen wichtigen Baustein zur Erzeugung resistenter Sorten liefern. Da die Phenylphenalene in Musaceae nur nach Induktion in größeren Mengen gebildet werden, wurden die verwandten Haemodoraceae als Untersuchungsobjekte gewählt. Diese Familie enthält konstitutiv große Mengen von Phenylphenalenonen. Aus bestimmten Gründen, die im Ergebnisteil beschrieben werden, wurde *Wachendorfia thyrsiflora* als Vertreter der Haemodoraceae für die hier beschriebenen Experimente genutzt.

## 1.2 *Wachendorfia thyrsiflora* – ein Vertreter der Haemodoraceae

### 1.2.1 Systematik, Verbreitung und Nutzen der Haemodoraceae

Die Haemodoraceae sind eine monokotyledone Pflanzenfamilie, die aus 14 Gattungen mit 103 Arten besteht. Sie ist eng verwandt mit den Familien Pontederiaceae, Philydraceae, Commelinaceae und Hanguanaceae<sup>[1]</sup>. Die Familie wird nochmals in zwei Subfamilien geteilt: Haemodoroideae mit den Gattungen *Barbaretta*, *Dilatris*, *Haemodorum*, *Lachnanthes*, *Pyrrorhiza*, *Schiekia*, *Wachendorfia* und *Xiphidium*, sowie Conostylidoideae mit *Anigozanthos*, *Blancoa*, *Conostylis*, *Phlebocarya* und *Tribonanthos*. Alle Conostylidoideae sind in Südwest-Australien beheimatet, *Haemodorum* kann auf dem gesamten australischen Kontinent gefunden werden. *Xiphidium*, *Schiekia* und *Phyrroriza* stammen aus Mittel- und Südamerika, *Barbaretta*, *Dilatris* und *Wachendorfia* aus Südafrika. *Lachnanthes* ist der einzige Vertreter, der auf der nördlichen Hemisphäre, im Osten der Vereinigten Staaten, beheimatet ist<sup>[2]</sup>. Der Name Haemodoraceae leitet sich von den stark rot bis violett gefärbten Wurzeln einiger Arten ab<sup>[3]</sup>. Daraus wurde auch der deutsche Name „Blutwurzler“ hergeleitet. Die Färbung wird durch sogenannte Phenylphenalene hervorgerufen, deren Vorhandensein zunächst als chemotaxonomisches Merkmal benutzt wurde<sup>[2]</sup>. Mittlerweile sind diese Substanzen jedoch auch in anderen Familien nachgewiesen worden (siehe 1.3.1). Spezielle Bedeutung haben die Haemodoraceae in Australien erlangt. Die Aborigines benutzten *Haemodorum* als Färbemittel, Arzneimittel gegen Ruhr und zum Teil auch als Nahrungsmittel<sup>[4]</sup>. Heutzutage wird *Anigozanthos* als Zierpflanze auch hierzulande verwendet. Narkotische Effekte werden *Lachnanthes caroliniana* zugeschrieben und dem Haemocorin aus *Haemodorum corymbosum* wird anti-tumorale und anti-bakterielle Aktivität nachgesagt<sup>[2]</sup>.

### 1.2.2 Das Untersuchungsobjekt *Wachendorfia thyrsiflora*

Die Gattung *Wachendorfia* (Burm.) besteht aus 4 Arten, die alle in der Kapregion Südafrikas heimisch sind. Zwei von ihnen wurden erstmalig 1757 von Burman beschrieben <sup>[5]</sup>. Im Gegensatz zu den anderen drei Arten bevorzugt *Wachendorfia thyrsiflora* (Abb. 1.1) Habitate in immerfeuchten Marschen und an Flüssen. Die Pflanzen können bis zu 25 Meter hoch werden <sup>[2]</sup>. Sie blühen von Anfang September bis Ende November mit großen, gelben Blüten mit langen Staubblättern in einer dichten Rispe <sup>[5]</sup>. Die Chromosomenzahl beträgt 15 <sup>[6]</sup>.

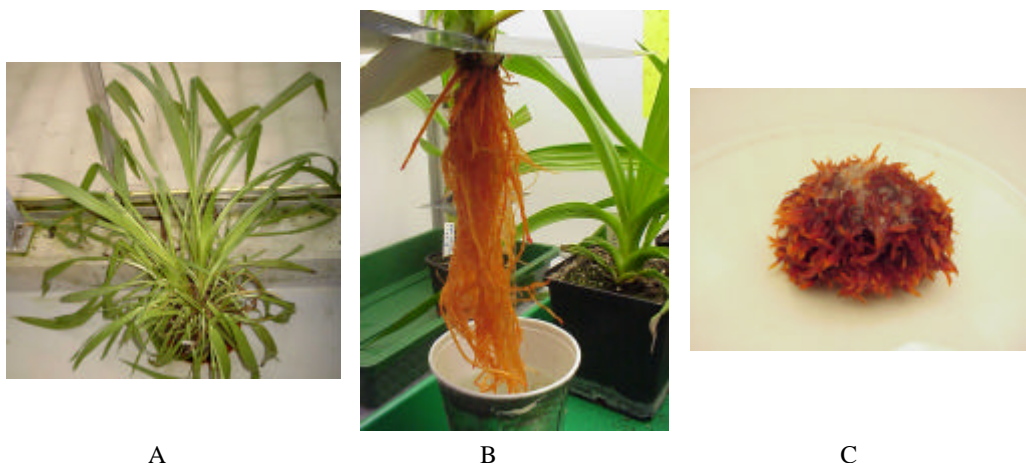
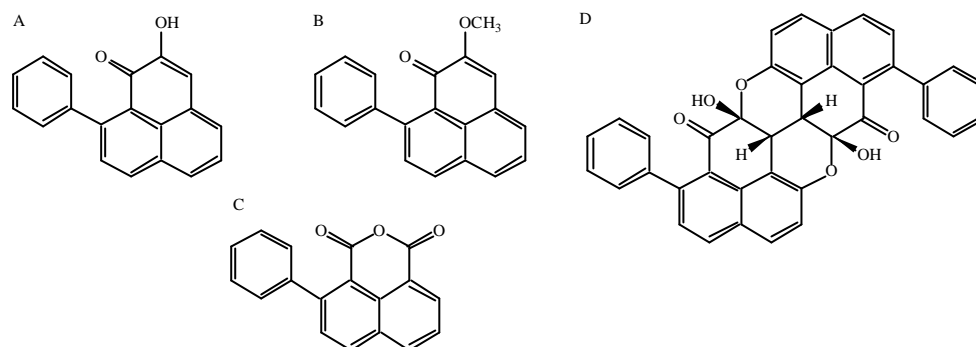


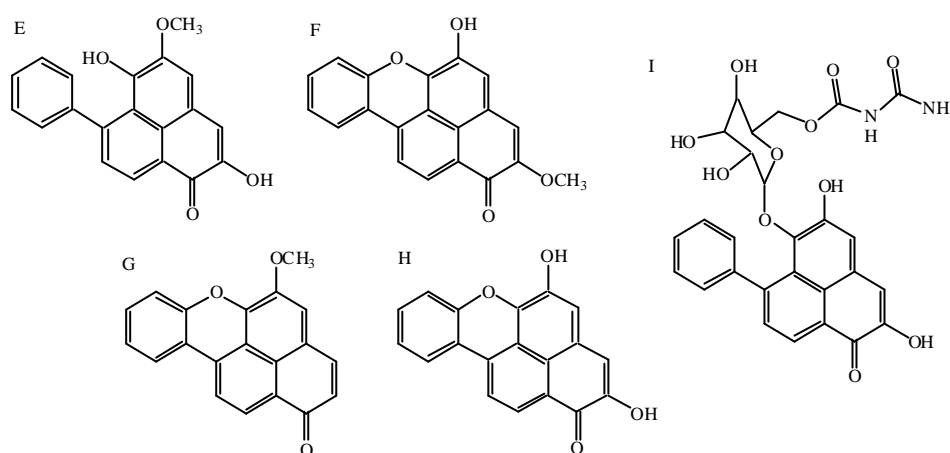
Abb. 1.1: *Wachendorfia thyrsiflora*: A: Ganzpflanze im Gewächshaus, B: Wurzel einer Hydrokultur (Foto: Stefan Opitz), C: Wurzelkultur.

*Wachendorfia thyrsiflora* weist ein großes Spektrum an Phenylphenalenonen und verwandten Strukturen auf. Abb. 1.2 zeigt die bisher in *Wachendorfia thyrsiflora* nachgewiesenen Naturstoffe, geordnet nach biosynthetischen Gruppen. Es handelt sich ausschließlich um Phenylphenalenone und daraus abgeleitete Strukturen. Speziell für die hier vorgestellte Arbeit ist es wichtig zu erwähnen, dass andere phenolische Verbindungen wie Stilben- und Chalconderivate in *Wachendorfia thyrsiflora* bisher nicht gefunden wurden.

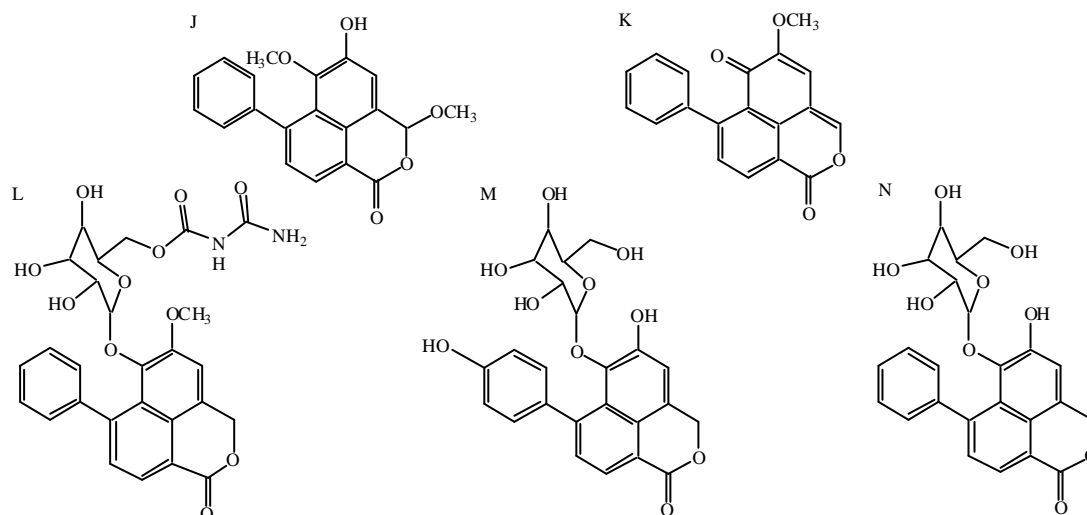
## Phenylphenalenone ohne Sauerstofffunktion in 5- und 6-Position



## Phenylphenalenone mit Sauerstofffunktion in 5- und/oder 6-Position



## Phenylphenalenone mit Sauerstoff im Ring (Phenylbenzoisochromenone)

Abb. 1.2: Phenylphenalenone und davon abgeleitete Verbindungen aus *Wachendorfiathyrsiflora*

A: Anigorufon<sup>[7]</sup>, B: Methoxy anigorufon<sup>[8]</sup>, C: 4-Phenyl-benzo[de]isochromen-1,3-dion<sup>[8]</sup>, D: Anigorootin<sup>[9]</sup>, E: Haemodorin<sup>[10]</sup>, F: 5-Hydroxy-2-methoxy-6-oxa-benzo[def]chrysen-1-on<sup>[11]</sup>, G: 5-Methoxy-6-oxa-benzo[def]chrysen-1-on<sup>[12]</sup>, H: 2,5-Dihydroxy-6-oxa-benzo[def]chrysen-1-on<sup>[11]</sup>, I: 6-O-[(6''-O-Allophanyl)-β-D-glucopyranosyl]-2,5-dihydroxy-7-phenyl-phenalen-1-on<sup>[7]</sup>, J: 5-Hydroxy-3,6-dimethoxy-7-phenyl-3H-benzo[de]isochromen-1-on<sup>[7]</sup>, K: 5-Methoxy-7-phenyl-benzo[de]isochromen-1-on<sup>[11]</sup>, L: 6-O-[(6''-O-Allophanyl)-β-D-glucopyranosyl]-5-methoxy-7-phenyl-3H-benzo[de]isochromen-1-on<sup>[7]</sup>, M: 6-O-(β-D-glucopyranosyl)-5-hydroxy-7-(p-hydroxy-phenyl)-3H-benzo[de]isochromen-1-on; N: 6-O-(β-D-glucopyranosyl)-5-hydroxy-7-phenyl-3H-benzo[de]isochromen-1-on.

### 1.3 Phenylphenalene

#### 1.3.1 Strukturelle Diversität, Vorkommen und Bedeutung der Phenylphenalene

Der Name der Phenylphenalene leitet sich von den Bestandteilen dieser Substanzen ab. Ein Phenalengerüst wird durch eine Ketofunktion und einen Phenylring modifiziert (Abb. 1.3). Letzterer kann sich in verschiedenen Positionen relativ zur Ketofunktion befinden, die entsprechend den Nomenklaturregeln die Positionsnummer 1 hat. Diese Grundstruktur wird sehr vielfältig modifiziert durch weitere Sauerstofffunktionen in verschiedenen Positionen. Diese können z.T. auch glykosyliert z.B. mit Glukose (Abb. 1.2 M und N) und Zellubiose (z.B. im Haemocorin <sup>[13,14]</sup>) vorliegen. Außerdem können Phenyl- und Phenalenonring durch eine Etherbrücke ein weiteres Mal verknüpft sein (Oxabenzochrysenon-Typ, z.B. die Strukturen F, G und H in Abb. 1.2). Bei den Phenylbenzochromenonen wird dagegen ein Kohlenstoff im Phenalenonring durch Sauerstoff (z.B. Strukturen J - N in Abb. 1.2) ersetzt.

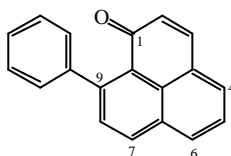


Abb. 1.3: Grundstruktur der 9-Phenyl-1H-phenalene

Die Phenylphenalene sind aromatische Verbindungen, bei denen alle Kohlenstoffatome  $sp^2$ -hybridisiert sind. Solche Mehrfachbindungssysteme absorbieren im nahen ultravioletten und sichtbaren Licht, wodurch die Verbindungen gelb bis violett erscheinen. Die Färbung ist bei tautomeriefähigen Phenylphenalenonen (z.B. Abb. 1.2 E) vom pH-Wert abhängig. Die Phenylphenalene weisen ein hohes Dipolmoment von  $12.8 \times 10^{-30}$  und eine nicht unbeträchtliche Basizität auf ( $pK_B = 0.4$ ). Damit sind sie säurelöslich und bilden stabile Salze mit starken Säuren <sup>[15]</sup>.

Phenylphenalene und verwandte Verbindungen wurden nicht ausschließlich in Haemodoraceae sondern auch in den Pontederiaceae <sup>[16,17]</sup>, den Strelitziaceae <sup>[18]</sup> und den Musaceae <sup>[19,20]</sup> gefunden. Besonders in den Musaceae ist die Konzentration an diesen Verbindungen bei gesunden Pflanzen sehr gering, wird jedoch deutlich bei Infektionen erhöht <sup>[21-24]</sup>. Damit kann man hier von einer Induzierbarkeit ausgehen und von Phytoalexinen sprechen. Obwohl Haemodoraceae relativ große Mengen an konstitutiv vorhandenen Phenylphenalenonen aufweisen, gibt es auch hier Hinweise auf Induzierbarkeit, zumindest einiger Verbindungen <sup>[25]</sup>. Über die weitere biologische Bedeutung dieser Verbindungen gibt es wenige gesicherte Erkenntnisse. Für einige Inhaltsstoffe wurden (insbesondere als

Mischungen) anti-tumorale, anti-bakterielle, anti-mikrobielle und fungitoxische Aktivitäten festgestellt. Außerdem scheinen einige Tiere empfindlich auf Haemodoraceae wie *Lachnanthes caroliniana* <sup>[26]</sup> und *Haemodorum corymbosum* <sup>[4]</sup> zu reagieren. Zumindest einige der in diesen Pflanzen enthaltenen Phenylphenalene sind phototoxisch.

### 1.3.2 Der Forschungsstand zur Biosynthese der Phenylphenalene

Ein wesentlicher Teil der Synthese aromatischer Verbindungen erfolgt in Pflanzen unter Verwendung der aromatischen Aminosäure Phenylalanin (z.B. bei Flavonoiden und Lignan). Im Phenylpropanoid-Weg werden daraus Zimtsäure und *p*-Cumarsäure bzw. ihre aktivierten CoA-Ester synthetisiert (Abb. 1.4). Dies erfolgt in drei Schritten: Oxidative Desaminierung (PAL), P-450-abhängige Oxygenierung (zur Synthese von *p*-Cumarsäure, C4H), Ligation mit HSCoA (4CL).

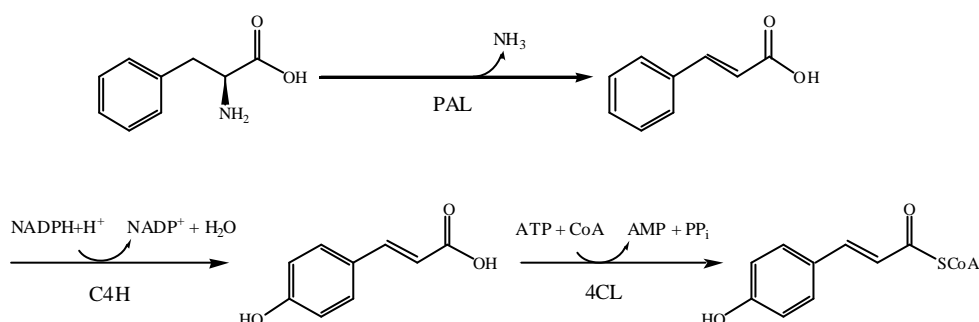


Abb. 1.4: Biosynthese des *p*-Cumaroyl-CoA. Die Abkürzungen bedeuten: PAL: Phenylalanin-Ammonium-Lyase, C4H: *trans*-Cinnamat-4-Monooxygenase, 4CL: *p*-Cumarsäure-CoA-Ligase.

Fütterungsexperimente mit [<sup>13</sup>C]- bzw. [<sup>14</sup>C]Zimtsäure und [<sup>13</sup>C]Dihydrozimtsäure in *Anigozanthos preissii* zeigten, dass zwei Phenylpropanoidmoleküle in Anigorufon eingebaut werden <sup>[27,28]</sup>. Außerdem konnte durch Fütterung von [2-<sup>13</sup>C]Acetat der Einbau des C-2 in Position 6a der Phenylphenalene nachgewiesen werden <sup>[29]</sup>. Neben einem Mol Zimtsäure kann auch ein Mol *p*-Cumarsäure oder Dihydro-*p*-cumarsäure in Anigorufon eingebaut werden (Abb. 1.5 A). Dagegen wird Hydroxyanigorufon (Abb. 1.5 B) aus zwei Molekülen *p*-Cumarsäure bzw. Dihydro-*p*-cumarsäure aufgebaut <sup>[30]</sup>. Damit konnte der Ursprung aller Kohlenstoffatome der Phenylphenalene nachgewiesen werden.

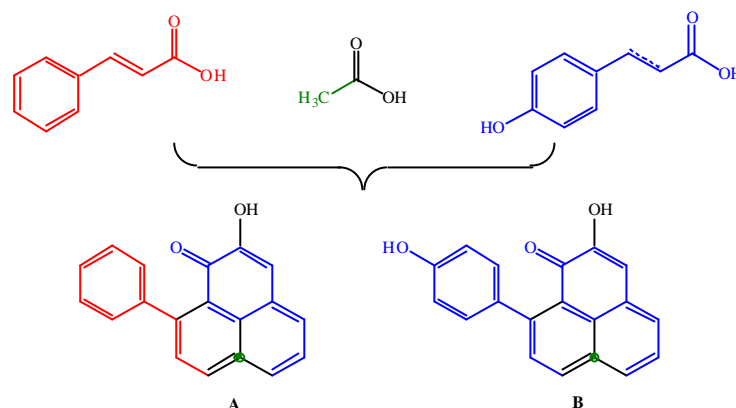


Abb. 1.5: Herkunft der Kohlenstoffatome der Phenylphenalenone am Beispiel von Anigorufon (A) und Hydroxy anigorufon (B). Rot: Teile aus Zimtsäure, blau: Teile aus *p*-Cumarsäure oder Dihydro-*p*-cumarsäure, grüner Punkt: C-2 von Acetat, --- Einfach- oder Doppelbindung.

Schon 1961 wurde von Thomas postuliert, dass bei der Ausbildung des C<sub>19</sub>-Kohlenstoffgerüsts aus zwei C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-Einheiten und einem Molekül Acetat ein lineares Diarylheptanoid als Intermediat in der Biosynthese der Phenylphenalenone auftreten sollte <sup>[31]</sup>. Dies konnte durch den Einbau eines [2-<sup>13</sup>C]Diarylheptanoids (Abb. 1.6) in Anigorufon bewiesen werden <sup>[27]</sup>. Damit wurde nachgewiesen, dass Phenylphenalenone aus linearen Diarylheptanoiden gebildet werden und daher eine Untergruppe der Diarylheptanoide sind. *Wachendorfia thyrsiflora*, das Untersuchungsobjekt dieser Arbeit, ist somit als eine reiche Quelle von Diarylheptanoiden anzusehen, auch wenn diese dort nicht in linearer Form, sondern in ihrer zyklischen Ausprägung als Phenylphenalenone vorliegen. Lineare Diarylheptanoide wurden bisher in Phenylphenalenone produzierenden Pflanzen nur in *Musa* <sup>[32]</sup> und in Spuren im Nektar von *Anigozanthos flavidus* und *A. manglesii* gefunden. Letzteren Verbindungen fehlen allerdings die zur Zyklisierung erforderlichen Strukturmerkmale. Wahrscheinlich stellen die meisten linearen Diarylheptanoide in der Zelle nur kurzlebige Intermediate dar und werden sofort vom nächsten Enzym umgesetzt, sodass ihre Konzentration unter der Nachweisgrenze bleibt.

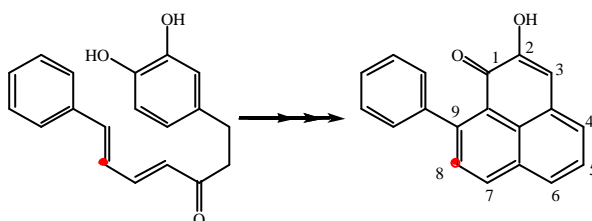


Abb. 1.6: Biosynthetischer Einbau eines Diarylheptanoids in Anigorufon <sup>[27]</sup> (• = <sup>13</sup>C).

Die Ursache für das rasche Durchlaufen der linearen Diarylheptanoid-Struktur in der Phenylphenalenon-Biosynthese einerseits und die Unfähigkeit zur Zyklisierung in anderen Fällen wird in strukturellen Merkmalen der Diarylheptanoid-Intermediate vermutet. Nach der

in Abb. 1.7 dargestellten hypothetischen Biosynthese verläuft die Zyklisierung nach einem 4+2-Zykloadditionsmechanismus <sup>[30]</sup>. Die unmittelbare Vorstufe z.B. für eine Diels-Alder-Reaktion erfordert (1) ein Dienstrukturmerkmal, (2) ein Dienophil und (3) eine Konformation, die beiden Gruppen erlaubt, in die Zyklisierungsreaktion einzutreten <sup>[33]</sup>. Sind alle Merkmale vorhanden, kommt es offensichtlich zu einer raschen Zyklisierung. Eine Akkumulation solcher als Substrate der Diels-Alder-Reaktion geeigneten Diarylheptanoide findet nicht statt. Fehlt eines dieser Merkmale, kann es zur Akkumulation von Diarylheptanoiden über die Nachweisgrenze kommen. Für die als Diarylheptanoid-Intermediate der Phenylphenalenonbiosynthese postulierten Strukturen sind alle Bedingungen optimal erfüllt. Solche Diarylheptanoide enthalten einen Endionring, ein Dien und eine flexible, sp<sup>3</sup>-C-Atome-enthaltende intramolekulare Brücke zwischen diesen Reaktionspartnern <sup>[33]</sup>. Anschließend sind weitere enzymatische Reaktionen, wie Dehydrogenierungen, Oxidoreduktionen und Methylierungen erforderlich. Dies ist jedoch abhängig vom jeweilig zu bildenden Phenylphenalenon.

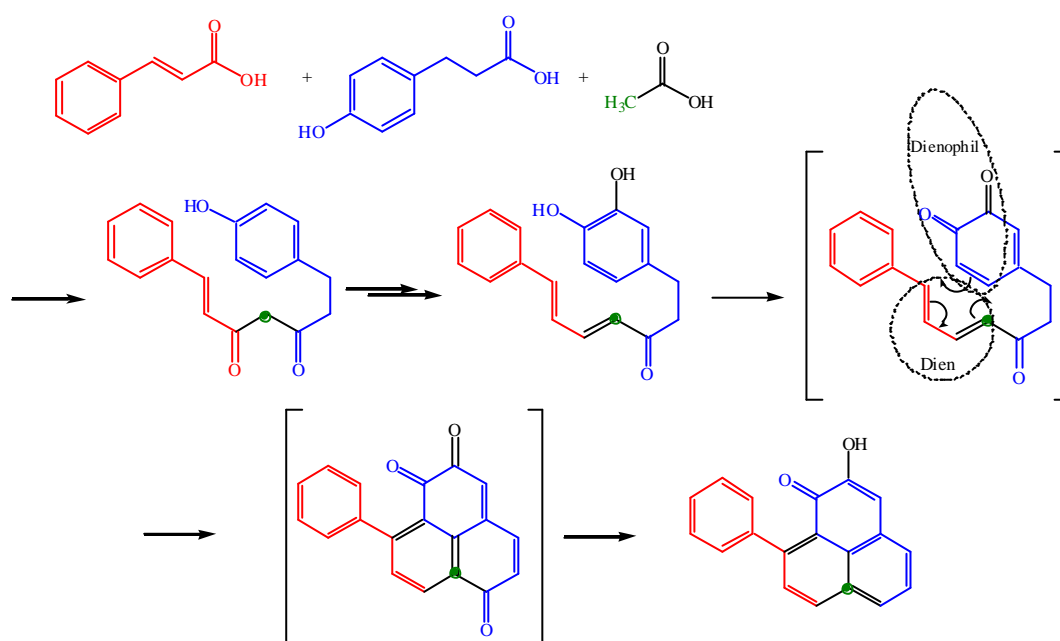


Abb. 1.7: Biosynthese von Anigorufon in Haemodoraceae <sup>[30]</sup>.



## 1.4 Diarylheptanoide als Intermediate der Phenylphenalenonbiosynthese

### 1.4.1 Vorkommen, Strukturen und Bedeutung der Diarylheptanoide

#### *1.4.1.1 Vorkommen und Bedeutung der Diarylheptanoide*

Im Gegensatz zu Phenylphenalenonen sind offenkettige und lineare Diarylheptanoide im Pflanzenreich weit verbreitet und zwar nicht nur in Monokotyledonen, sondern auch in einigen Dikotyledonen. Zu den Pflanzenfamilien, die Diarylheptanoide enthalten, gehören Aceraceae, Betulaceae, Burseraceae, Leguminosae, Musaceae, Myricaceae und Zingiberaceae<sup>[34]</sup>. Vor kurzem wurde auch im Nektar von *Anigozanthos*-Blüten (Haemodoraceae) ein Diarylheptanoid nachgewiesen. Das wohl bekannteste Diarylheptanoid ist Curcumin, der gelbfärbende Bestandteil von Curry (Abb. 1.8 B). Es ist auch das pharmakologisch am besten untersuchte Diarylheptanoid<sup>[35]</sup>. Es zeigt ebenso wie andere strukturell sehr ähnliche Verbindungen anti-oxidative und anti-inflammatorische Wirkungen. Da die Entstehung eines Tumors oft mit einer Entzündungsreaktion einhergeht, überrascht es nicht, dass Curcumin ein potenter Inhibitor der Mutagenese und chemisch induzierten Karzinogenese ist<sup>[36,37]</sup>. Die Funktion von Diarylheptanoiden für die Pflanze ist jedoch weitestgehend unklar. Da die strukturelle Ähnlichkeit von Diarylheptanoiden mit Flavonoiden sehr groß ist, wird vermutet, dass auch die Funktionen in der Pflanze ähnlich sind. Dazu zählen z.B. UV-schützende Wirkungen und Funktionen als Phytoalexine. Die Grundstruktur der Diarylheptanoide kann wie folgt definiert werden: Arylring-C<sub>7</sub>-Arylring. Dabei wird zwischen linearen und zyklischen Diarylheptanoiden<sup>[34]</sup> unterschieden. Bei den zyklischen Diarylheptanoiden kann man weiterhin in makrozyklische Diarylheptanoide, makrozyklische Diaryletherheptanoide, Diarylheptanoide mit zyklisierter C<sub>7</sub>-Kette und Phenylphenalenonen unterscheiden. In den letzten Jahren wurden außerdem sehr komplexe Strukturen mit ankondensierter Chalcon-, Flavon- oder Pyroneinheit<sup>[38]</sup> sowie Dimere<sup>[39]</sup> nachgewiesen. Im Folgenden sollen die einzelnen Gruppen etwas genauer vorgestellt werden. Die Gruppe der Phenylphenalenone wurde bereits ausführlich in 1.3 beschrieben.

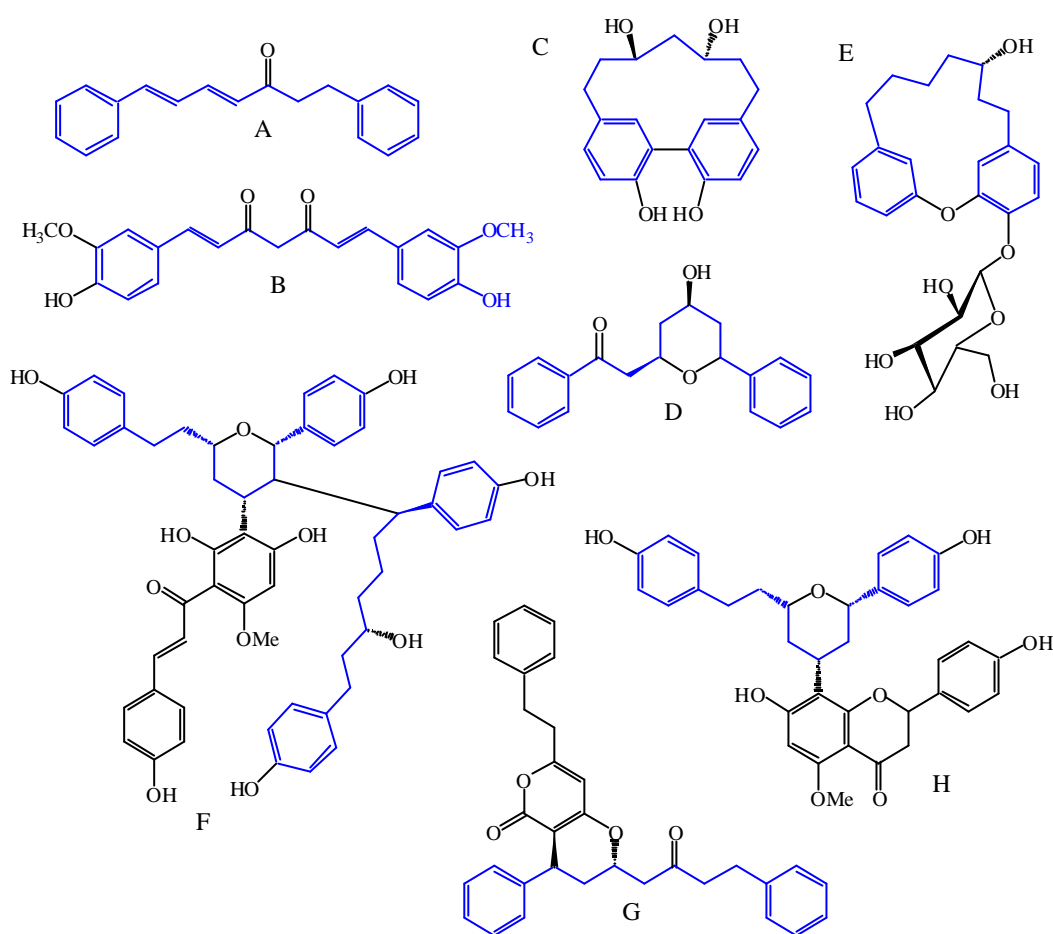


Abb. 1.8: Verschiedene Diarylheptanoide: A: (4*E*, 6*E*)-1,7 Diphenyl-hepta-4,6-dien-3-on<sup>[40]</sup>, B: Curcumin<sup>[41]</sup>, C: (3*S*, 5*S*)-Alnusdiol<sup>[42]</sup>, D: Diospongin B<sup>[43]</sup>, E: Acerosid B<sub>1</sub><sup>[44]</sup>, F: Blepharocalyxin E<sup>[39]</sup>, G: Katsumadain A<sup>[45]</sup>, H: Epicalyxin K<sup>[46]</sup>. Blau: Diarylheptanoidstrukturteil.

#### 1.4.1.2 Lineare Diarylheptanoide

Eine Reihe von Strukturen weist keine Substituenten an den Phenylringen auf (nichtphenolische Diarylheptanoide). Diese wurden hauptsächlich in *Alnus*- und *Alpinia*-, aber auch in *Curcuma*-Arten gefunden. Häufig sind hier Hydroxy- und Ketofunktionen in der 3- oder 5-Position der C<sub>7</sub>-Kette, seltener in 1-Position zu finden. Außerdem treten in 1- und 3-Position der C<sub>7</sub>-Kette *trans*-Doppelbindungen auf. Von einigen dieser Diarylheptanoide aus *Curcuma xanthorrhiza* (z.B. Abb. 1.8 A) sind anti-inflammatorische Wirkungen bekannt<sup>[36,47]</sup>.

Die Gruppe der phenolischen linearen Diarylheptanoide ist die größte Gruppe und kommt hauptsächlich in den Betulaceae und Zingiberaceae vor, wurde aber auch bei den Aceraceae und Fabaceae gefunden. Der wichtigste Vertreter ist das Curcumin (Abb. 1.8 B). Diese Gruppe unterscheidet sich von den nichtphenolischen Diarylheptanoiden durch das Vorhandensein von Hydroxygruppen in einem oder beiden Phenylringen, die sich stets in *p*-

Stellung zur C<sub>7</sub>-Kette befinden und nicht methyliert, selten glykosyliert sind. Weiterhin können sich Sauerstofffunktionen in *m*-Stellung befinden. Diese können auch methyliert sein. Am C-3 der C<sub>7</sub>-Kette befindet sich stets eine Sauerstofffunktion, möglich ist dies jedoch auch in 1- und 5-Position. Auch Doppelbindungen sind häufig vorhanden. Im Gegensatz zu den nichtphenolischen Diarylheptanoiden gibt es hier oft Glykoside. Der Zucker ist stets  $\beta$ -verknüpft mit einer der Hydroxygruppen des Diarylheptanoids. Meist handelt es sich um Glukose, außerdem sind Xylose, Apiose<sup>[48]</sup>, Arabinose<sup>[49]</sup> und Gallose<sup>[50]</sup> bekannt. Es treten auch Disaccharid-Konjugate auf.

#### 1.4.1.3 Diarylheptanoide mit zyklisierter C<sub>7</sub>-Kette

In den letzten Jahren wurden einige Diarylheptanoide mit zyklischer C<sub>7</sub>-Kette entdeckt, z.B. in *Zingiber officinale*<sup>[51]</sup>, *Centrolobium* sp.<sup>[52]</sup> und *Alpinia blepharocalyx*<sup>[39]</sup>. Die C<sub>7</sub>-Kette dieser Verbindungen bildet dabei einen Pyronring. Hydroxylfunktionen können sich an den aromatischen Ringen und am Pyronring befinden und dabei methyliert oder acetyliert vorliegen<sup>[51]</sup>. Die bekannte medizinische Wirkung dieses Typs von Diarylheptanoiden beschränkt sich auf den Nachweis von inhibierenden Aktivitäten von Diosponginen (Beispiel Diospongin B, Abb. 1.8 D) aus *Dioscorea spongiosa* bei der Knochenrückresorption<sup>[43]</sup>.

#### 1.4.1.4 Makrozyklische Diarylheptanoide und Diaryletherheptanoide

Diese Substanzen entstehen vermutlich aus den nichtzyklisierten Vorstufen<sup>[53]</sup> durch P-450-abhängige Phenolkopplung<sup>[54,55]</sup>. Häufig treten zyklische und offenkettige Formen in derselben Pflanze auf. Die Grundstruktur dieser Substanzen ist ein Diarylheptanoid, in dem die Phenylringe *meta*, *meta*-verbrückt sind (z.B. bei Alnusdiol aus *Betula maximowicziana*<sup>[42]</sup>, Abb. 1.8 C). Bei Diaryletherheptanoiden werden die Phenylringe durch eine Sauerstoffbrücke miteinander verbunden (z.B. Acerosid B<sub>1</sub>, Abb. 1.8 E). Solche Diarylheptanoide wurden in Betulaceae und Myricaceae, mit Etherbrücke auch in Aceraceae und Bursaraceae, gefunden. Einige solcher Strukturen aus *Myrica rubra* zeigten Inhibition der Stickstoffmonoxid-Produktion in lipopolysaccharid-aktivierten Peritoneal-Makrophagen<sup>[56]</sup>, die ein typisches Symptom von Entzündungsreaktionen ist. Diese Wirkung war wesentlich reduziert, wenn die Substanzen glykosyliert vorlagen. Das nichtglykosylierte Acerogenin B zeigt eine hemmende Wirkung auf die Ausschüttung von  $\beta$ -Hexosamidase in Mastzellen, einem Marker für allergische Reaktionen<sup>[44]</sup>.

#### 1.4.1.5 Komplexe Diarylheptanoide

Eine Reihe sehr komplexer Strukturen wurde in *Alpinia*<sup>[38,39,45,46,57-60]</sup> gefunden. Dabei handelte es sich um Chalcon-, Flavon- und Stilbenkonjugate von Diarylheptanoiden sowie dimere Diarylheptanoide. Die Samen von *Alpinia blepharocalyx* werden in der traditionellen chinesischen Medizin bei Magenbeschwerden verwendet. Die isolierten Verbindungen wie

Epicalyxin K (Abb. 1.8 H) zeigten anti-proliferative Wirkungen gegen verschiedene humane Krebszelllinien. Das Vorhandensein einer Chalcon- oder Flavonstruktur verstärkt die anti-proliferative Wirkung beträchtlich <sup>[57]</sup>. Aus *Alpinia katsumadai* wurden Verbindungen mit Pyronstruktur isoliert (Katsumadain A <sup>[45]</sup>, Abb. 1.8 G). Dimere Diarylheptanoide wurden lediglich in *Alpinia blepharocalyx* gefunden <sup>[39,59,60]</sup>. Neben zwei Diarylheptanoid-Einheiten (z.B. Blepharocalyxin E, Abb. 1.8 F) können diese Strukturen auch zusätzlich noch eine Chalconeinheit besitzen. Als medizinische Effekte dimerer Diarylheptanoide wurden anti-proliferative Wirkung gegen Krebszelllinien, Inhibition der Stickstoffmonoxid-Bildung in Makrophagen und Erbrechen-hemmende Wirkungen beschrieben.

#### 1.4.2 Forschungsstand der Biosynthese der Diarylheptanoide

Anfang der 70-er Jahre wurden von Roughley und Whiting <sup>[61]</sup> zum ersten Mal Untersuchungen zur Biosynthese von Curcumin durchgeführt. Dabei gab es zwei Ansatzpunkte (Abb. 1.9):

- A) Die Synthese aus zwei Phenylpropanoid-Einheiten und einer Malonateinheit (Abb.1.9 A).
- B) Die Synthese aus einer Phenylpropanoid-Einheit und 5 Einheiten Malonat sowie anschließende Hydroxylierungen bzw. Methylierungen (Abb.1.9 B).

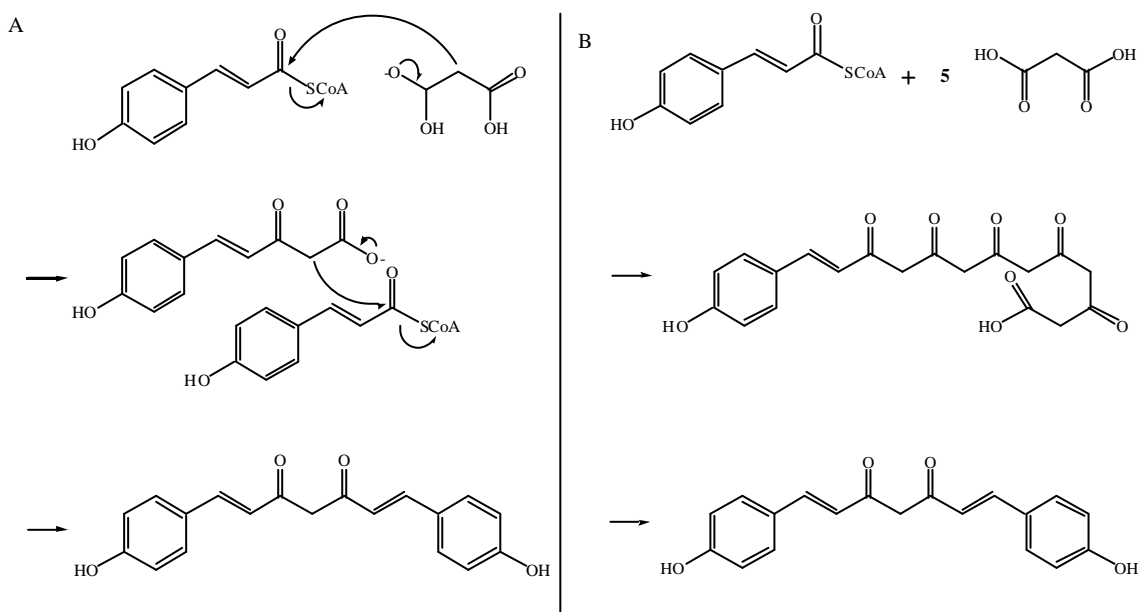


Abb.1.9: Hypothetische Biosyntheserouten zu Diarylheptanoiden, A: Synthese aus zwei Phenylpropaneinheiten und einer Malonat-Einheit, B: Synthese aus einer Phenylpropaneinheit und 5 Malonat-Einheiten.

Der Einbau von [1-<sup>14</sup>C]- und [3-<sup>14</sup>C]Phenylalanin in Curcumin konnte schon damals eindeutig nachgewiesen werden. Bei der Fütterung von [2-<sup>14</sup>C]Malonat bzw. Natriumacetat wurde die Markierung bei Abbauxperimenten jedoch nicht ausschließlich im zentralen C<sub>4</sub> der C<sub>7</sub>-Kette gefunden, sodass zwischen beiden Varianten nicht eindeutig unterschieden werden konnte.

Inoue <sup>[62]</sup> fand 1987 keinen Einbau von  $[1-^{14}\text{C}]$ Malonsäure. Dies hätte jedoch bei Vorschlag B der Fall sein müssen, weil hier zwei der drei Kohlenstoffatome von Malonat, also eine Acetat-Einheit, eingebaut werden sollten. Bei Vorschlag A hingegen sind zwei Decarboxylierungen erforderlich, sodass die  $[1-^{14}\text{C}]$ -Markierung nicht in das Molekül eingebaut, sondern als Kohlendioxid freigesetzt würde. Diese Erkenntnis wurde durch Thomas und Edwards <sup>[63-65]</sup> unterstützt, die zeigten, dass 9-Phenylphenalenone (siehe 1.3.2) aus Phenylalanin, Tyrosin und einem Kohlenstoffatom von Acetat synthetisiert werden. Fütterungsversuche mit  $[2-^{13}\text{C}]$ Acetat in unserer Arbeitsgruppe konnten dies eindeutig nachweisen <sup>[29]</sup>.

Zu den an diesem Stoffwechselweg beteiligten Enzymen gibt es keinerlei experimentelle Ergebnisse. Es wurde postuliert, dass pflanzliche Polyketidsynthasen (PKS) vom Typ III beteiligt sein könnten <sup>[66]</sup>. Diese Enzyme kondensieren eine oder mehrere Malonyl-CoA-Einheiten an eine Startereinheit, die in den einzelnen Enzymen sehr verschieden sein kann. Anschließend folgt bei diesen Enzymen häufig eine Zyklisierung der erhaltenen Polymalonatkette.

Die Reaktion einer vermuteten Diarylheptanoidsynthase weist starke Ähnlichkeit mit der Reaktion von Typ III-PKS auf. Auch hier sollte eine Malonyl-CoA-Einheit an eine Phenylpropanoid-Einheit gekoppelt werden. Es folgt jedoch keine Zyklisierung, sondern die Kondensation einer zweiten Phenylpropanoid-Einheit. Diese zweite Kondensation könnte nach demselben Mechanismus erfolgen. Es stellt sich jedoch die Frage, ob beide Kondensationen von demselben Enzym katalysiert werden oder ob für den zweiten Schritt ein weiteres Enzym erforderlich ist. Wegen der im ersten Schritt offensichtlich notwendigen Kondensation eines Phenylpropanoid-Starters mit Malonyl-CoA gehen wir in dieser Arbeit davon aus, dass eine Diarylheptanoidsynthase strukturelle Ähnlichkeit mit Typ-III-Polyketidsynthasen haben sollte.

## **1.5 Polyketidsynthasen**

### 1.5.1 Allgemeine Bemerkungen zu Polyketidsynthasen

Die Polyketidsynthasen (PKS) zählen zu den Acyltransferasen (EC 2.3.) und zeichnen sich durch den Transfer von Acetyleinheiten auf unterschiedlichste Startereinheiten aus. Zu den derzeit ca. 170 Acyltransferasen, die keine Aminogruppen übertragen (EC 2.3.1), zählen auch die Fettsäuresynthasen. Es werden außerdem drei Typen von PKS dazu gerechnet. Die Typen I und II kommen in Bakterien vor, Typ III in Pflanzen und Bakterien:

Typ I Hierbei handelt es sich Multienzymkomplexe. Diese bestehen aus einer Reihe von Modulen, die jeweils das aktive Zentrum für die Durchführung eines Biosyntheseschrittes

enthalten. Als Beispiel gilt hier die Erythromycinbiosynthese im Bakterium *Saccharopolyspora erythraea* <sup>[67]</sup>. Dieses Enzym benutzt als Starter Propionyl-CoA und als Kettenverlängerer Methylmalonyl-CoA (sechs Moleküle pro Molekül Erythromycin). Außerdem benötigt es NADPH.

Typ II: Iterative Multienzymkomplexe monofunktioneller Proteine. Im Gegensatz zu Typ I sind die Multienzymkomplexe vom Typ II dissoziierbar und nicht immer zusammenhängend im Genom kodiert. PKS II katalysieren z.B. die bakterielle Synthese von Resistomycin in *Streptomyces resistomycificus* <sup>[68]</sup>. Dieser Enzymkomplex kondensiert ein Malonyl-CoA (Starter) mit neun weiteren Malonyl-Resten (Verlängerer) und führt anschließend eine spezifische Zyklisierung zum Resistomycin durch.

Beide Typen benötigen ein Acylcarrierprotein zum Transport der sich bildenden Produktkette von einer Enzymfunktion zur nächsten.

Typ III: Pflanzliche Polyketidsynthasen. Diese unterscheiden sich sehr stark von den PKS vom Typ I und II. Es handelt sich um kleine homodimere Proteine, deren Untereinheiten zwischen 40 und 45 kDa groß sind. Sie kooperieren im Unterschied zu den Typen I und II nicht mit einem Acylcarrier-Protein, da nur ein aktives Zentrum vorliegt und zwischen den Kondensationsreaktionen keine Oxidoreduktionen wie z.B. bei Erythromycin durchgeführt werden.

### 1.5.2 Struktur und Mechanismus der Polyketidsynthasen vom Typ III

1975 wurde zum ersten Mal eine „Flavanonsynthase“ aus *Petroselinum hortense* gereinigt und die Eigenschaften dieses Enzyms näher charakterisiert <sup>[69]</sup>. Die erste Klonierung von Chalconsynthasen erfolgte 1985 mit zwei Genen aus *Petunia hybrida* <sup>[70]</sup>. Dies ermöglichte genauere Untersuchungen der Enzymaktivität und -spezifität sowie das Auffinden verwandter Enzyme durch molekularbiologische Methoden. Die erste Röntgenkristallstruktur (Abb. 1.10) einer Chalconsynthase aus der Luzerne (*Medicago sativa*) <sup>[71]</sup> ermöglichte 1999 exakte Untersuchungen zum Mechanismus des Enzyms.

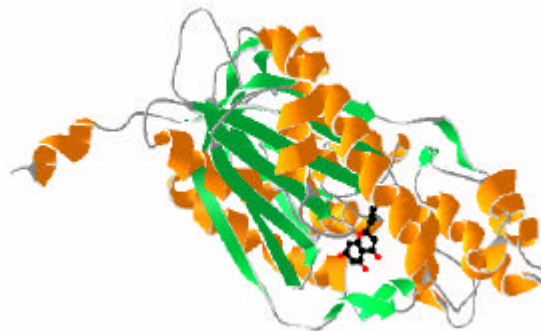


Abb. 1.10: Röntgenkristallstruktur eines Monomers der Chalconsynthase grün: Faltblattstrukturen, orange: Helices) aus Luzerne, kokristallisiert mit dem Produkt Naringenin (dargestellt als Kugelstabsmodell).

Mittlerweile wurde eine Reihe von weiteren Kristallstrukturen dieses Proteins mit verschiedenen Liganden und Mutationen sowie die Struktur der 2-Pyronsynthase publiziert. Diese und weitere Untersuchungen (z.B. die Hemmung des aktiven Cysteins des Enzyms durch Iodacetamid <sup>[72]</sup>) bewiesen den in Abb. 1.11 dargestellten Reaktionsmechanismus von Typ III-PKS für den ersten Kondensationsschritt zum Diketid-CoA. Zunächst greift ein Cystein (in Chalconsynthase aus *Medicago sativa* Aminosäure 164) das Carbonyl-Kohlenstoffatom einer Phenylpropan-Einheit an. Dabei wird HSCoA freigesetzt und die Phenylpropan-Einheit an das Enzym gebunden. Im zweiten Schritt wird Malonyl-CoA mit Hilfe von His303 und Asn336 gebunden und decarboxyliert. Das entstehende Acetyl-CoA-Anion greift anschließend am Carbonyl-Kohlenstoffatom der enzymgebundenen Phenylpropan-Einheit an, ein Diketid-CoA wird gebildet und dabei vom Enzym abgespalten. Dieses Diketid-CoA wird anschließend wiederum von Cys164 gebunden, jetzt allerdings am früheren C-1 von Malonyl-CoA. Dann wiederholt sich bei Chalconsynthasen die Kondensation noch zweimal bevor das entstehende Tetraketid zyklisiert wird und das Produkt (bei Chalconsynthase z.B. Naringenin-chalcon, siehe 1.5.3.1) das Enzym verlässt.

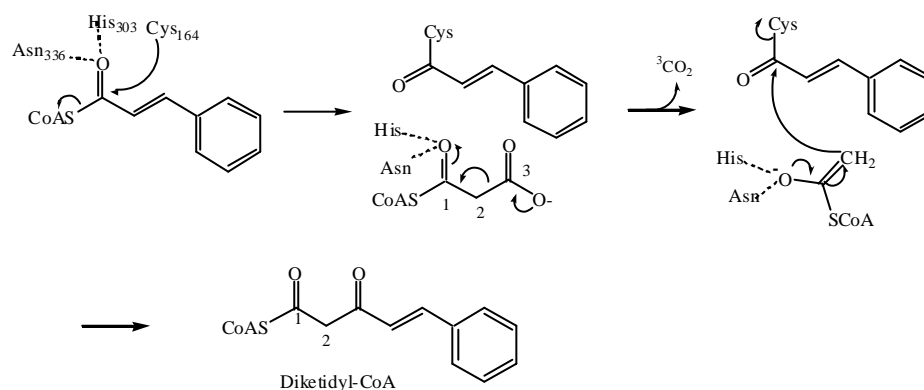


Abb.1.11: Mechanismus der ersten durch pflanzliche PKS III katalysierten Kondensation am Beispiel der Reaktion von Cinnamoyl-CoA mit Malonyl-CoA.

Der prinzipielle Mechanismus der Kondensationsreaktion ist bei allen Typ III-PKS derselbe. Die verschiedenen PKS unterscheiden sich jedoch in (1) dem Startermolekül, (2) der Anzahl von Kondensationen, (3) der Zyklisierungsweise und (4) der Beteiligung einer Polyketidreduktase.

### 1.5.3 Beispiele für Polyketidsynthesen

#### *1.5.3.1 Chalconsynthase*

Dieses Enzym ist der Prototyp aller Typ III-PKS und mit ihm wurden die meisten Untersuchungen durchgeführt. Es katalysiert die Synthese des C<sub>15</sub>-Grundgerüsts der

Flavonoide, einer Gruppe von Sekundärstoffen, die ubiquitär in den Pflanzen vorkommen. Zu ihnen gehören die Anthocyane, Catechine, Flavanone, Flavone, Flavonole, Isoflavanoide und Proanthocyanidine <sup>[73]</sup>. Sie erfüllen wichtige Aufgaben wie Pigmentierung und UV-Schutz, dienen als Phytoalexine und Signalmoleküle bei der Interaktion mit Rhizobien und können essentiell für die Pollenfertilität sein <sup>[74-76]</sup>. Als Effekte auf die menschliche Gesundheit werden anti-karzinogene, anti-oxidative, anti-phlogistische, östrogene und spasmolytische Wirkungen beschrieben.

Als Startsubstrat der CHS dient *p*-Cumaroyl-CoA, welches mit drei Molekülen Malonyl-CoA zu einem Tetraketid kondensiert wird, das anschließend durch Ringbildung zwischen C-1 und C-6 zu Naringenin-chalcon zyklisiert (Abb. 1.12). Dieses isomerisiert *in vitro* zu (2R/S)-Naringenin, während es *in vivo* von einer Chalconisomerase stereospezifisch zu (2S)-Naringenin umgesetzt wird <sup>[77]</sup>. In manchen Fällen kooperiert eine Polyketid-Reduktase mit der Chalconsynthase und führt vor der Zyklisierung der Malonat-Kette eine Reduktion der Keto-Funktion an C-5 durch. Dieser Sauerstoff wird dann bei der Zyklisierung als Wasser eliminiert <sup>[73,78-80]</sup>. Als Produkt dieser Reaktion wird 6'-Deoxychalcon erhalten. Manche CHS bevorzugen andere Starter als *p*-Cumaroyl-CoA, z.B. CHS 2 aus *Hordeum vulgare* Feruloyl- und Caffeyoyl-CoA <sup>[81]</sup>. Die meisten CHS akzeptieren neben ihren natürlichen Startern auch andere Substrate wie Cinnamoyl-CoA und Caffeyoyl-CoA. Auch werden kurzkettige aliphatische CoA-Ester (z.B. *n*-Hexamoyl-CoA) umgesetzt <sup>[82]</sup>. Jedoch werden bei diesen Startern wesentlich häufiger unphysiologische Produkte beobachtet, die sich schon nach einer oder zwei Kondensationen vom Enzym lösen. Chalconsynthasen aus verschiedenen Pflanzen zeigen untereinander zwischen 65 - 85 % Identität der Aminosäuresequenz und weisen hochkonservierte Regionen z.B. an der CoA-Bindungsstelle auf, wodurch das Auffinden neuer Sequenzen mit molekularbiologischen Methoden erleichtert wird. In vielen Pflanzenarten finden sich Multigenfamilien mit mehreren Vertretern von Chalconsynthasen. Diese werden häufig gewebespezifisch exprimiert oder sie unterscheiden sich in ihrer Regulation <sup>[83]</sup>. Zum Beispiel werden die fünf CHS-mRNAs (A - E) der Winde (*Ipomoea purpurea*) während der Blütenentwicklung in den einzelnen Blütenteilen unterschiedlich stark exprimiert. In den Antheren wird zunächst CHS E exprimiert, während in späteren Abschnitten der Blütenbildung die mRNAs der CHS A - D vorherrschen und CHS E nicht mehr exprimiert wird. In den Blättern werden keine CHS-mRNAs exprimiert, im Stengel nur CHS D <sup>[84]</sup>.

#### 1.5.3.2 Stilbensynthase

Dieses Enzym nutzt dieselben Starter wie Chalconsynthasen und führt ebenfalls drei Kondensationen durch. Allerdings wird das entstehende Tetraketid in anderer Weise



zyklisiert. Die Ringbildung erfolgt zwischen C-2 und C-7. Außerdem wird das entstandene Produkt decarboxyliert (Abb. 1.12). Stilbene kommen in taxonomisch entfernten Arten wie *Hydrangea macrophylla* und *Rheum rhaponticum* vor. In der Familie der Haemodoraceae wurden Stilbene bei *Anigozanthos* gefunden, jedoch nicht bei *Wachendorfia thyrsiflora*. Die Funktion der Stilbene liegt in der Pathogenabwehr. Sie werden bei Pathogenbefall und Verletzung induziert und sind daher als Phytoalexine zu betrachten <sup>[85]</sup>. Je nach bevorzugtem Starter und damit erhaltenem Produkt werden die Stilbensynthesen in Resveratrol-, Pinosylvin- und Bibenzylsynthesen (aus *p*-Cumaroyl-, Cinnamoyl- bzw. Phenylpropionyl-CoA) unterteilt. Allerdings akzeptieren auch die Stilbensynthesen weitere Phenylpropanoyl-CoA-Ester. Aus der Sequenzanalyse heraus ist es nicht möglich, Chalconsynthesen und Stilbensynthesen zu unterscheiden. Die einzelnen Stilbensynthesen einer Pflanzengattung zeigen große Ähnlichkeit untereinander und größere Ähnlichkeit zu den Chalconsynthesen aus derselben Pflanzengattung als zu anderen Stilbensynthesen. Daher wird angenommen, dass sich Stilbensynthesen in der Evolution mehrfach aus Chalconsynthesen entwickelt haben <sup>[86]</sup>.

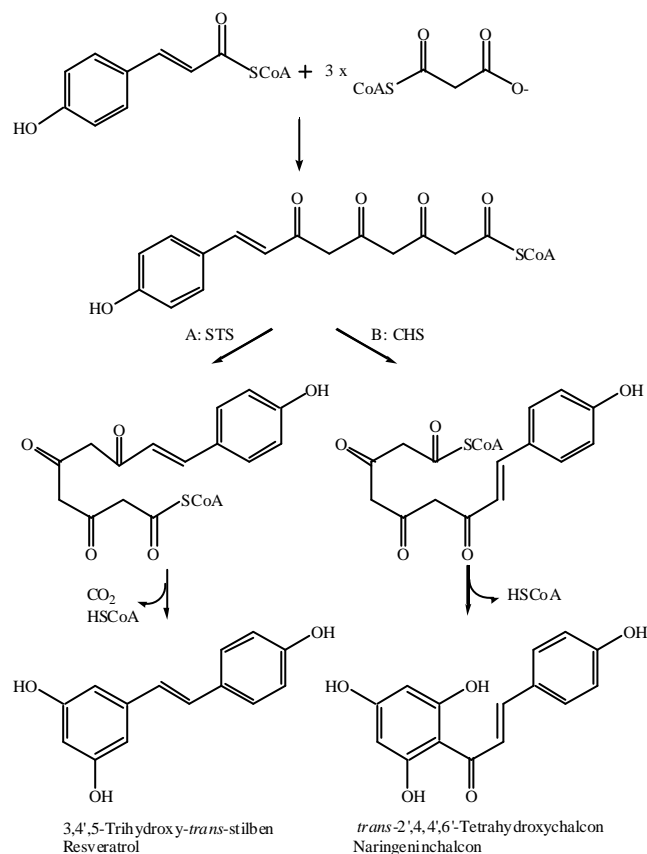


Abb. 1.12: Vergleich der Reaktionen von A: Stilben (STS)- und B: Chalconsynthase (CHS).

### 1.5.3.3 Weitere Polyketidsynthasen

Neben diesen beiden wichtigsten Gruppen der Typ III-Polyketidsynthasen wurden noch eine Reihe weiterer Polyketidsynthasen charakterisiert oder postuliert (Abb. 1.13). Die Benzalacetonsynthase aus *Rubus idaeus* <sup>[87]</sup> führt nur eine Kondensation und Decarboxylierung aus, während die Styrylpyrconsynthase aus *Equisetum arvense* <sup>[88]</sup> zwei Kondensationen aber keine Decarboxylierung durchführt. Da beide Produkte auch als Nebenprodukte der Chalconsynthase-Reaktion auftreten, wird vermutet, dass es sich bei diesen Polyketidsynthasen um biogenetische Vorläufer der heutigen Chalconsynthasen handelt <sup>[88,89]</sup>. Die Biphenylsynthase <sup>[90]</sup> (*Sorbus aucuparia*) unterscheidet sich von der Benzophenonsynthase <sup>[91]</sup> (z.B. in Gentianaceae) dadurch, dass sie eine Decarboxylierung und eine Stilbensynthase-ähnliche Zyklisierung durchführt.

Nicht immer stammen die Starter aus dem Phenylpropan-Stoffwechsel. So verwendet die Benzophenonsynthase 3-Hydroxybenzoyl-CoA, die Phloroisovalerophenonsynthase (aus *Humulus lupulus*) bevorzugt Isovaleroyl- und Isobutyryl-CoA <sup>[92]</sup> und die Acridonsynthase N-Methyl-anthraniloyl-CoA <sup>[93]</sup>. Olivetol ist das Produkt einer Polyketidsynthase aus *Cannabis sativa*, die n-Hexanoyl-CoA und drei Malonyl-CoA als Starter verwendet <sup>[94]</sup>. Aus dem Rhabarber (*Rheum palmatum*) wurde vor kurzem eine Polyketidsynthase isoliert, die Acetyl-CoA mit sechs Malonyl-CoA unter Decarboxylierung und Zyklisierung zu Aloeson umsetzt <sup>[95]</sup>. Im übrigen wurden auch in Bakterien Enzyme gefunden, die ähnliche Reaktionen wie pflanzliche Polyketidsynthasen durchführen. Das Protein phlD <sup>[96]</sup> aus *Pseudomonas fluorescens* kondensiert Acetoacetyl-CoA mit zwei Malonyl-CoA zu einem Phloroglycin-Derivat. Das rppA-Protein <sup>[97]</sup> aus *Streptomyces griseus* führt vier Kondensationen von Malonyl-CoA zu Tetrahydroxynaphthalin aus.

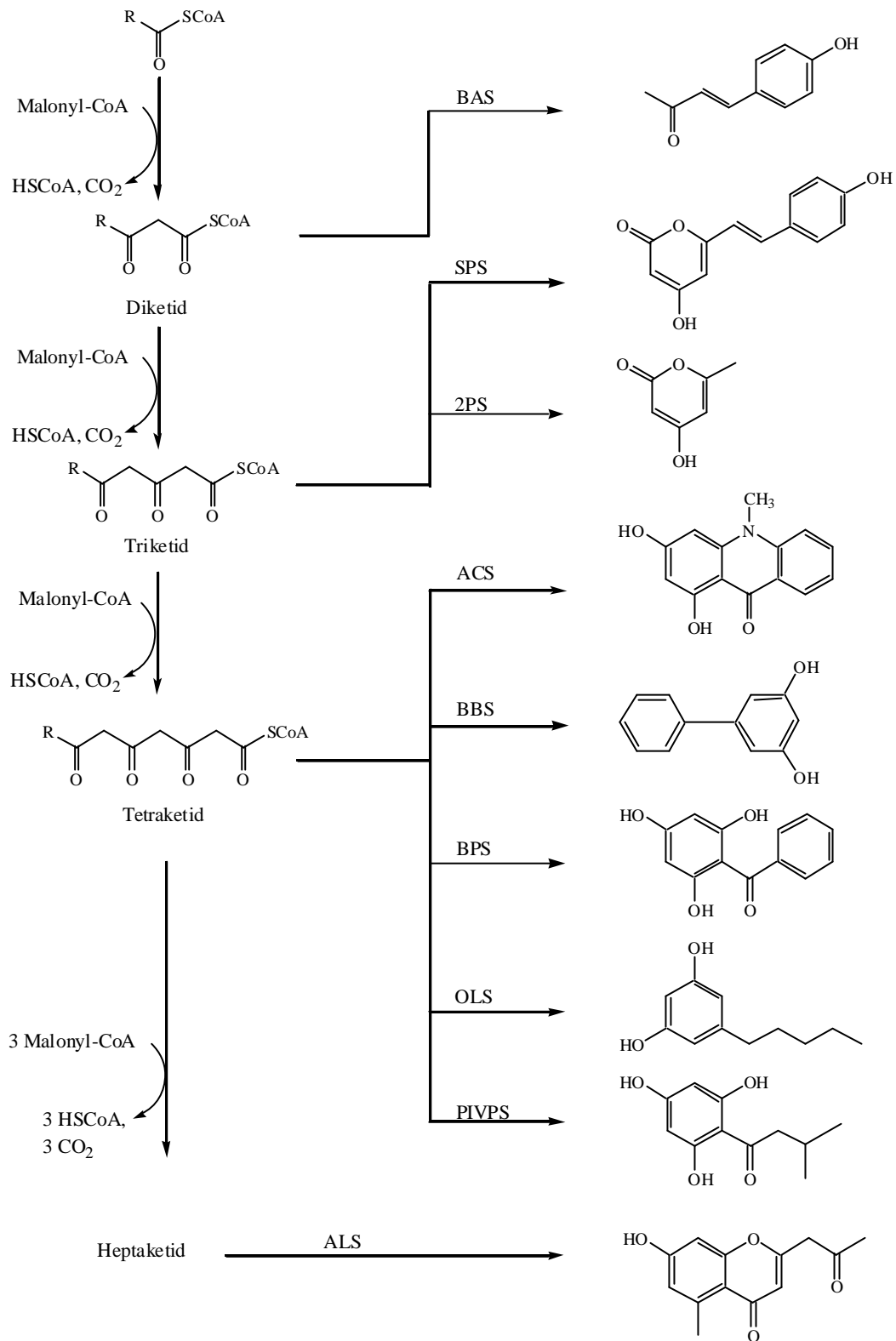


Abb. 1.13 Reaktionen weiterer pflanzlicher Polyketidsynthesen.

ALS: R = CH<sub>3</sub>, Aloesonsynthase; OLS: R = CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>, Olivetolsynthase; PIVPS: R = (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>, Phloroisovalerophenonsynthase; BPS: R = Phenylring, Benzophenonsynthase; BBS: R = Phenylring, Bibenzylsynthase; ACS: R = Ph-NH-CH<sub>3</sub>, Acridonsynthase; 2PS: R = CH<sub>3</sub>, 2-PyrONSynthase; SPS: R = CH=CH-Ph-OH, StyrylpyrONSynthase; BAS: R = CH=CH-Ph-OH, Benzalacetonsynthase.

## 1.6 Zielstellung

Ausgangspunkt für diese Arbeit waren Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, die zeigten, dass die Phenylphenalenone eine Untergruppe der Diarylheptanoide sind. Es wurde auch nachgewiesen, dass lineare Diarylheptanoide eine biosynthetische Vorstufe der Phenylphenalenone sind. Die Diarylheptanoide verfügen über wachsende medizinische und ökologische Bedeutung und die an der Biosynthese beteiligten Enzyme sind noch nicht bekannt. Damit erscheint die Aufklärung dieses Stoffwechselweges ein lohnendes Ziel. Die Wahl des Pflanzenmaterials fiel auf die Familie der Haemodoraceae, obwohl diese ökonomisch keine bedeutende Rolle spielen. Sie weisen jedoch den Vorteil auf, vor allem in der Wurzel hohe Konzentrationen von Phenylphenalenonen zu akkumulieren, was auf eine ständig aktive Enzymsynthese schließen lässt. Desweiteren wurden in der Arbeitsgruppe bereits umfangreiche Untersuchungen zu den enthaltenen Sekundärstoffen und deren Biosynthese durchgeführt. Die vorhandenen Wurzelkulturen ermöglichen die Gewinnung einer großen Menge Pflanzenmaterials in kurzer Zeit.

Da es sich im ersten Schritt der Biosynthese der Diarylheptanoide um die Kondensation eines Phenylpropanoids (Starter) mit Malonyl-CoA (Verlängerer) handelt, wurde postuliert, dass Polyketidsynthasen des Typ III an der Biosynthese beteiligt sind. Der zweite Schritt der Biosynthese umfasst dagegen die Kondensation des im ersten Schritt erhaltenen Intermediates mit einer zweiten Phenylpropanoid-Einheit (Beender). Bisher ist kein Beispiel von PKS bekannt, in dem dies der Fall ist. Es bestehen die folgenden beiden Möglichkeiten:

- (1) Eine Diarylheptanoidsynthase besitzt die Funktionalität einer PKS III und die Fähigkeit zur Kondensation des intermediären Diketids mit einer weiteren Phenylpropanoid-Einheit.
- (2) Es liegt eine PKS III vor, die das Kondensationsprodukt eines Phenylpropanoid-Starters mit Malonyl-CoA freisetzt bzw. an ein kooperierendes Enzym weitergibt. Dieses Protein führt dann die zweite Kondensation mit einer weiteren Phenylpropanoid-Einheit durch.

Oftmals treten in einer Pflanze mehrere PKS nebeneinander auf. Es war daher zu erwarten, dass mehrere Kandidaten des PKS III-Typs gefunden werden. Eine Bestimmung der vom Enzym durchgeführten Umsetzungen ist bei diesen Proteinen lediglich nach Expression und Durchführung von Enzymtests möglich, da die Sequenz keinen Aufschluss über die Aktivität liefern kann.

Das primäre Ziel der Arbeit ist damit die Untersuchung von Polyketidsynthasen hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Diarylheptanoid-Biosynthese und damit der Phenylphenalenon-Biosynthese. Ein wichtiger Punkt umfasst dabei die Frage, ob PKS auch in der Lage sind, größere Moleküle als Malonyl-CoA als Kettenverlängerer zu benutzen. Ist dies nicht der Fall,

muss davon ausgegangen werden, dass die Biosynthese von Diarylheptanoiden entweder durch Enzyme eines anderen Typs durchgeführt wird oder neben einer PKS Typ III noch ein zweites Enzym beteiligt ist, welches keine oder nur geringe Ähnlichkeit mit PKS aufweist.

Als Schwerpunkte der Arbeit können daher wie folgt definiert werden:

- (1) Synthese geeigneter Ausgangsstoffe zum Einsatz im Enzymassay,
- (2) Synthese von Referenzverbindungen zum Produktnachweis,
- (3) Auswahl geeigneter Pflanzenarten,
- (4) Isolierung von mRNA aus den gewählten Pflanzen,
- (5) Amplifikation von Sequenzen, die Ähnlichkeit mit Polyketidsynthasen haben,
- (6) Heterologe Expression der Proteine, die durch diese Sequenzen kodiert werden,
- (7) Charakterisierung der Enzyme mittels Enzymtests und
- (8) Analyse der Ergebnisse im Hinblick auf eine Beteiligung der isolierten Enzyme an der Biosynthese von Diarylheptanoiden und Phenylphenalenonen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material und Geräte

Es wurden die in Tabelle 2.1 bezeichneten Geräte verwendet. Mit Ausnahme der in Tabelle 2.2 bezeichneten Materialien wurden alle chemischen Substanzen bei Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D), Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (D) oder VWR International, Darmstadt (D) bezogen. Auf die Geräte zur Massenspektrometrie (MS) und Kernmagnetischen Resonanzspektroskopie (NMR) wurde in Abschnitt 2.7 eingegangen.

Tabelle 2.1: Laborgeräte.

| Gerät                     | Modell                         | Herstellerfirma   |
|---------------------------|--------------------------------|---|
| Zentrifugen               | Avanti J-25, J-20XP<br>5415 R  | Beckman-Coulter, Palo-Alto, USA<br>Eppendorf AG, Hamburg, D                 |
| Rotationsverdampfer       | Rotavapor R114                 | Büchi Labortechnik, Flawil, CH  |
| Peristaltikpumpe          | MC-MS-3                        | Ismatec, Glatbrugg-Zürich, CH   |
| Thermocycler              | Mastercycler gradient          | Eppendorf AG, Hamburg, D  |
| Vakuumkonzentrator        | Concentrator 5301              | Eppendorf AG, Hamburg, D  |
| HPLC-System               | HP 1100 mit VWD oder DAD       | Agilent Technologies, Palo-Alto, USA  |
| Radioaktivitätsdetektor   | Flow Scintillation Analyzer    | Canberra-Packard, Dreieich, D   |
| Elektrophoreseapparat     | Protean II<br>HE33             | Biorad Laboratories, Hercules, USA<br>Hoefer Scientific, San Francisco, USA |
| Stromversorgungsgerät     | EPS 35001XL                    | Amersham Biosci Ltd, Buckinghamshire, UK                                    |
| French Press              | Aminco                         | SLM Instr. Inc., Rochester, USA   |
| pH-Meter                  | pH330                          | WTW, Weilheim, D  |
| Photometer                | Lambda16                       | Perkin Elmer, Wellesley, USA  |
|                           | 20 GeneSys™                    | Spectronic® Instr., Leeds, UK   |
| Waagen                    | SBC22, SPB52                   | Scaltec Instr., Göttingen, D  |
| Thermostat                | Techne Dri®-Block              | Thermodux, Wertheim, D  |
| Thermomixer               | Thermomixer comfort            | Eppendorf AG, Hamburg, D  |
| Wasseraufbereitung        | RiOS 16, Milli-Q synthesis     | Millipore, Billerica, USA   |
| Autoklav                  | Varioklav®                     | H+P Labortechnik, Oberschleißheim, D  |
| Sterilbank                | HeraSafe                       | Kendro GmbH, Langenselbold, D   |
| Brutschrank               | B6120                          | Kendro GmbH, Langenselbold, D   |
| Inkubationschüttelschrank | Certomat® BS-1                 | Braun Biotech GmbH, Melsungen, D  |
| Schüttler                 | TR-250                         | Infors AG, Bottmingen, D  |
| UV-Linker                 | Stratalinker                   | Stratagene, La Jolla, USA   |
| Sequenzierer              | ABI Prism®-3100, 16-Kapillaren | Applied Biosystems, Foster City, USA  |
| Filmentwicklungsmaschine  | SRX101                         | Konica Europe GmbH, Hohenbrunn, D   |
| Geldokumentationssystem   | Gene Genius                    | Syngene, Cambridge, UK  |

Tabelle 2.2: Herkunft der verwendeten Materialien.

| Firma                                     | Material   |
|---|--|
| Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D             | Acrylamid-Lösung: 30 % (w/v)-Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1),<br>1 kb Plus DNA Ladder, Trizol, dNTP's, TOPO-TA-cloning-Kit,<br>pCR®II-TOPO®, IPTG, <i>E. coli</i> TOP10F', Hefextrakt, Pepton, X-<br>Gal, Kanamycin, T4 Ligase, Low DNA Mass Ladder, <i>Bam</i> HI,<br><i>Hind</i> III, <i>Eco</i> RI |
| Amersham Biosci. Ltd, Buckinghamshire, UK | APS, TEMED, Bromphenolblau, <i>E. coli</i> NM522, <i>E. coli</i> NP66,<br>λExCell <i>Not I</i> / <i>Eco</i> RI/ CIP, Ready-to-go DNA labelling beads,<br>ProbeQuant G-50 micro columns, HiTrap® Chelating Columns,<br>Sephadex™ G-35M-Säulen   |
| VEB isocommerz, Herzburg, D               | Dinatrium-ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)   |
| Novex Electrophoresis GmbH, Frankfurt, D  | Colloidal Blue Stain-Kit   |
| Serva, Heidelberg, D                      | Kinetin  |

|                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| Eppendorf AG, Hamburg, D              | Taq-Polymerase  |
| MWG-Biotech, Ebersberg, D             | Primer  |
| Roche, Mannheim, D                    | 5'/3'-RACE-Kit, High Pure PCR Purification Kit                                  |
| Qiagen GmbH, Hilden, D                | QIAquick Gel Extraction Kit, DyeEx Spin Kit-Säulen                              |
| Stratagene, La Jolla, USA             | <i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, PfuTurbo DNA Polymerase                 |
| MP Biomedicals, Irvine, USA           | Ampicillin  |
| New England Biolabs, Beverly, USA     | <i>Dpn</i> I, [ <sup>32</sup> P]dCTP  |
| Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren, D | NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid-Kit   |
| Perkin Elmer, Wellesley, USA          | Ultima-Flo AP   |
| Applied Biosystems, Foster City, USA  | Big Dye   |
| Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D | Bio-Rad Protein Assay   |
| Deutero GmbH Kastellaun, D            | CDCl <sub>3</sub> , MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> , Aceton- <i>d</i> <sub>6</sub> |
| Hartmann Analytics, Braunschweig, D   | [2- <sup>14</sup> C]Malonyl-CoA   |

## 2.2 Chemische Synthese

### 2.2.1 Coenzym A-Derivate

#### 2.2.1.1 Synthese von Succinimidestern am Beispiel von Ferulasäure-Succinimid

Ferulasäure (1 mmol, 0.19 g), N-Hydroxysuccinimid (1 mmol, 0.11 g) und DCC (1.05 mmol, 0.22 g) wurden in Ethylacetat (70 ml) gelöst und unter Argonatmosphäre 24 h gerührt. Anschließend wurde zur Trockne eingengt und das Rohprodukt mittels zweimaliger SC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH und *n*-Hexan/Ethylacetat) gereinigt. Analytische Daten: siehe Anhang 1.1.

#### 2.2.1.2 Synthese von Coenzym A-Derivaten am Beispiel von Cinnamoyl-CoA

Die Synthese erfolgte nach der Methode von Wang, Maier und Zenk <sup>[98]</sup>. Zimtsäure-Succinimidester (40 µmol, 10 mg) wurde in Aceton (1 ml), Coenzym A (20 µmol, 15 mg) in NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (0.05 M, 2 ml) gelöst. Die Zimtsäure-Succinimidester-Lösung wurde zur Coenzym A-Lösung getropft. Im Falle einer Präzipitatbildung wurde nochmals NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und Aceton zugegeben. Der Ansatz wurde 12 h im Eisbad unter Argon gerührt und anschließend über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Reinigung wurde zunächst das Aceton im Vakuum verdampft und die Probe 10 min zentrifugiert (13000 rpm). Der Überstand wurde mit NH<sub>4</sub>Ac versetzt (Endkonzentration: 4 % (w/v)). Die Trennung erfolgte mittels vorgewaschener RP18-Säulen (LiChrolut<sup>®</sup>500 mg, VWR International, Darmstadt). Zunächst wurde mit 4 % NH<sub>4</sub>Ac-Lösung nicht umgesetztes Coenzym A eluiert, anschließend mit Wasser der synthetisierte CoA-Ester. Mittels DC (Laufmittel *n*-Butanol/Wasser/Essigsäure 60:35:25) wurden produkthaltige Fraktionen detektiert. Diese wurden anschließend zur Trockne im Vakuum eingengt. Analytische Daten: siehe Anhang 1.2.

### 2.2.2 Diketid-N-Acetylcysteamin (NAC)-Derivate

Die Synthesestrategie folgte der von Gilbert 1995 vorgeschlagenen <sup>[99]</sup>.

Als Beispiel wurde die Synthese von Dihydro-*p*-cumarsäure-diketid-NAC (5-(4-Hydroxy-phenyl)-3-oxo-pentanthiolsäure-*S*-(2-acetylamino-ethyl)-ester) näher beschrieben:

Säurechlorid: 3-(4-Acetyl-phenyl)-propionsäure (2.5 mmol, 0.5 g) wurde in Benzol gelöst. Anschließend wurde Oxalylchlorid (6.7 mmol, 0.6 ml) langsam zugetropft. Der Ansatz wurde 15 min bei RT gerührt und anschließend 1 h unter Rückfluss gekocht. Nach Abkühlung wurde das Reaktionsgemisch mehrfach eingeeengt und in Benzol aufgenommen, um überschüssiges Oxalylchlorid zu entfernen. Die Ausbeute an 3-(4-Acetyl-phenyl)-propionsäurechlorid betrug 2.47 mmol (0.6 g, 98 % d. Th.).

Meldrumsäure-Addukt: Meldrumsäure (2.5 mmol, 0.42 g, 2,2-Dimethyl-[1,3]dioxan-4,6-dion) und DMAP (5.25 mmol, 0.64 g) wurden in Dichlormethan (3 ml) gelöst. 3-(4-Acetyl-phenyl)-propionsäurechlorid (2.47 mmol, 0.56 g) wurde in Dichlormethan (3 ml) gelöst und zum Meldrumsäure/DMAP-Gemisch getropft. Unter Argonatmosphäre wurde zunächst 1 h auf Eis und anschließend 2.5 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zweimal gegen HCl (0.1 N) und viermal gegen Wasser ausgeschüttelt, über Kieselgel und Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> filtriert und mit CHCl<sub>3</sub> (20 ml) und CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1:1, 40 ml) eluiert. Nach dem Einengen wurden 1.9 mmol (0.63 g) Meldrumsäureaddukt von Acetyl-phenylpropionsäure erhalten.

Acetyliertes NAC-Derivat: Das erhaltene Meldrumsäureaddukt wurde in Benzol (5 ml) gelöst. N-Acetylcysteamin (1.9 mmol, ca. 150 µl), gelöst in Benzol (1 ml), wurde zugetropft. Die Mischung wurde 9.5 h unter Rückfluss gekocht und nach Abkühlen eingeeengt. Es wurden 1.6 mmol (0.58 g) acetyliertes Dihydro-*p*-cumarsäure-diketid-NAC erhalten.

NAC-Derivat: Das Produkt (1.17 mmol, 0.41 g) wurde in Methanol (3 ml) gelöst und mit Natriummethanolat (6.3 ml, 41.3 mg Natrium in 9.7 ml Methanol, entspricht 1.17 mmol Natriummethanolat) versetzt. Es wurde Wasser (10 ml) hinzugefügt, weitere 5 min gerührt und anschließend mit HCl (1 N, 1 ml) angesäuert. Diese Mischung wurde dreimal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und die organische Phase mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Es wurde ein Produktgemisch (140 mg) erhalten, das mit präparativer DC (CHCl<sub>3</sub>:MeOH 95:8) aufgetrennt wurde. Nach Elution vom Kieselgel wurden 66.5 mg Dihydro-*p*-cumarsäure-diketid-NAC erhalten. Die Ausbeute betrug damit 0.25 mmol, 14 % d. Th. über alle Stufen.

Dihydrozimtsäure-diketid-NAC (3-Oxo-5-phenyl-pentanthiolsäure-*S*-(2)-acetylamino-ethyl-ester) wurde in derselben Weise in zwei Schritten aus 3-Phenylpropionylchlorid synthetisiert. Die ungesättigten NAC-Derivate wurden ebenfalls so synthetisiert. Jedoch wurde das Meldrumsäure-Addukt vor der Reaktion mit NAC durch SC (CHCl<sub>3</sub>:MeOH 50:1 bis 20:1) gereinigt. Alle analytischen Daten wurden in Anhang 1.3 dargestellt.



### 2.2.3 Diarylheptanoid-Synthese

#### 2.2.3.1 (4E)-1,7-Diphenyl-hept-4-en-3-on (Synthese nach <sup>[100]</sup>)

Dihydrozimtsäuremethylester: Phenylpropionylchlorid (30 mmol, 4.4 ml) wurde in trockenem MeOH (25 ml) unter Rühren gelöst und nach 1 h das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und gegen *n*-Hexan ausgeschüttelt. Der *n*-Hexanextrakt wurde mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingeeengt. Es wurden 2.17 g (13.2 mmol) Dihydrozimtsäuremethylester erhalten.

(2-Oxo-4-phenyl-butyl)-phosphonsäure-dimethylester (Wittig-Ylid): Methanphosphonsäure-dimethylester (66.2 mmol, 7.1 ml) wurde in THF (60 ml) gelöst. Es wurde Methyllithium (17.5 mmol, 28 ml einer 1.6 M Lösung) bei -78 °C zugetropft. Diese Mischung wurde 1 h lang bei -78 °C gerührt. Anschließend wurde Dihydrozimtsäuremethylester (13.2 mmol, 2.17 g) in THF (30 ml) gelöst und zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde langsam erwärmt und noch 3 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von festem (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gequenchet und nach Zugabe von Wasser mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Die Reinigung erfolgte durch SC in einem Gradienten von 100 % CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> zu CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20:1. Es wurden 3.3 g (12.8 mmol) Wittig-Ylid erhalten.

Diarylheptanoid: Das Ylid (5.8 mmol, 1.5 g), Phenylpropionaldehyd (6.4 mmol, 0.85 ml) und DBU (6.4 mmol, 0.96 ml) wurden in THF (60 ml) gelöst. Die Reaktionsmischung wurde 5 h unter Reflux gekocht und nach dem Abkühlen in Wasser gegossen. Dieses Gemisch wurde mit Ethylacetat extrahiert, die organische Phase mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach SC (*n*-Hexan/Ethylacetat, Gradient von 20:1 auf 8:1) wurden 222 mg (0.8 mmol, 14 % d. Th.) Produkt erhalten.

#### 2.2.3.2 (4E,6E)-1,7-Diphenyl-hept-4,6-dien-3-on

Die Synthesestrategie entspricht der von (4E)-3-Keto-1,7-diphenylhept-4-en, es wurde lediglich im dritten Schritt Zimtaldehyd statt Phenylpropionaldehyd eingesetzt.

#### 2.2.3.3 (4E,6E)-3-Hydroxy-1,7-diphenyl-hepta-4,6-dien

(4E,6E)-1,7-Diphenylhept-4,6-dien-3-on (20.2 mg, 77 μmol) wurde in MeOH (1 ml) gelöst und auf 0°C gekühlt. Es wurde NaBH<sub>4</sub> (0.08 mmol, 3 mg) zugegeben und 30 min bei 0°C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Aceton (1 ml) gestoppt. Das Lösungsmittel wurde in Vakuum entfernt und der Rückstand in CH<sub>3</sub>Cl (5 ml) aufgenommen. Die Mischung wurde filtriert. Nach dem Einengen wurden 15 mg (57 μmol, 73 % d. Th.) des Produktes erhalten.

#### 2.2.3.4 5-Hydroxy-1,7-diphenyl-heptan-3-on

Diese Verbindung wurde in einer Aldol-Kondensation aus 4-Phenyl-2-butanon und Phenylpropionaldehyd synthetisiert <sup>[100]</sup>. Zu einer Lösung von Lithiumisopropylamid (1.57 mmol) in THF wurde bei -78°C 4-Phenyl-2-butanon (1.35 mmol, 200 mg), gelöst in THF (5 ml) gegeben. Nach 15 min wurde Propionaldehyd (1.32 mmol, 0.17 ml in THF) zugetropft. Die Lösung wurde 20 min bei -78°C gerührt und die Reaktion anschließend mit gesättigter NH<sub>4</sub>Cl-Lösung gestoppt. Es wurde Wasser (10 ml) zugefügt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Extrakte wurden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, eingeeengt und säulenchromatographisch gereinigt. Es wurden 238 mg (0.9 mmol, 66 % d. Th.) Produkt erhalten.

#### 2.2.3.5 3,5-Diketo-1,7-diphenyl-heptan

5-Hydroxy-1,7-diphenylheptan-3-on (180 µmol, 51.4 mg) und PDC (540 µmol, 206 mg) wurden in Dichlormethan (3 ml) gelöst und gerührt. Nach 28 h wurde weiteres PDC (520 µmol, 200 mg) zugegeben und nochmals 24 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ether (10 ml) abgebrochen. Das Reaktionsgemisch wurde abfiltriert und der Feststoff mit Ether, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und Ethylacetat gewaschen. Die vereinigten Waschlösungen wurden im Vakuum eingeeengt. Die Reinigung des Produktes erfolgte mit präparativer DC (*n*-Hexan/Ethylacetat 6:1). Es wurden 3 mg (11 µmol, 6 % d. Th.) Produkt erhalten.

Die analytischen Daten der synthetisierten Diarylheptanoide wurden im Anhang 1.4 dargestellt.

### 2.3 Trennmethoden

#### 2.3.1 Chromatographische Trennungen

##### 2.3.1.1 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Diese Methode wurde zur Trennung von Enzymprodukten verwendet. Die HPLC-Geräte waren mit einem Diodenarraydetektor (DAD) oder mit einem variablen Wellenlängendetektor (VWD) und externem Radioaktivitätsdetektor ausgestattet. Die Trennung von Enzymprodukten erfolgte mit einer Supelcosil LC-18 Säule (250 x 2.1 mm, Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Als flüssige Phase wurde ein Gemisch aus Wasser mit 0.1 % Trifluoressigsäure und MeCN verwendet. Die Flussrate lag bei 0.25 ml·min<sup>-1</sup>. Die Säulentemperatur betrug konstant 24°C.

Verwendete Gradienten:

A: 0 - 40 min 10 - 50 % MeCN, 40 - 45 min 50 - 100 % MeCN, 45 - 50 min 100 % MeCN, 50 - 55 min 100 - 10 % MeCN

B: 0 - 30 min 20 - 50 % MeCN, 30 - 35 min 50 - 100 % MeCN, 35 - 40 min 100 % MeCN, 40 - 45 min 100 - 10 % MeCN

Zur Detektion  $^{14}\text{C}$ -markierter Verbindungen wurde nach der Elution Ultima-Flo AP-Szintillationsflüssigkeit ( $1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ) zugepumpt und diese Mischung im Radioaktivitätsdetektor vermessen. Die Kontrolle und Auswertung erfolgte mit dem Programm FLO-ONE for Windows.

### 2.3.1.2 Dünnschichtchromatographie (DC)

Diese Methode wurde zur Kontrolle des Verlaufs von Synthesen und während der Reinigung der Reaktionsprodukte verwendet. Es wurden Aluminiumfolien beschichtet mit Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator (F<sub>254</sub>) benutzt. Außerdem wurden Substanzgemische in kleinen Mengen mittels präparativer DC auf PSC-Platten 20 x 20 cm mit Fluoreszenzindikator (Kieselgel 60, 0.5 - 2 mm Dicke) getrennt, das Kieselgel mit interessierenden Banden herausgelöst und mit geeigneten Lösungsmitteln eluiert.

### 2.3.1.3 Säulenchromatographie (SC)

Diese Methode wurde im Wesentlichen zur Reinigung von Synthesegemischen angewendet. Es wurde Kieselgel 60 (Korngröße 0.063 - 0.2 mm) verwendet. Die jeweils verwendeten Lösungsmittelgemische wurden in Abschnitt 2.2 (chemische Synthese) beschrieben.

## 2.3.2 Elektrophoresen

### 2.3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von Proteinen genutzt. Es wurde eine Mini-PROTEAN<sup>®</sup>-II Elektrophoresezelle verwendet. Tabelle 2.3 zeigt die Zusammensetzung der Gele.

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Elektrophoresegele (System nach Laemmli<sup>[101]</sup>).

|                 | Trenngel                      | Sammelgel                     |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Wasser          | 4.85 ml                       | 6.4 ml                        |
| Puffer          | 1.5 ml 1.5 M Tris/HCl, pH 8.8 | 2.5 ml 0.5 M Tris/HCl, pH 6.8 |
| 10 % SDS        | 100 µl                        | 100 µl                        |
| Acrylamidlösung | 2.5 ml                        | 1 ml                          |
| 10 % APS        | 50 µl                         | 50 µl                         |
| TEMED           | 5 µl                          | 10 µl                         |

5 x Elektrodenpuffer:

15.0 g·l<sup>-1</sup> Tris  
72.2 g·l<sup>-1</sup> Glycin  
5.0 g·l<sup>-1</sup> SDS

Probenpuffer:

4.8 ml Wasser  
1.2 ml Sammelgelpuffer  
2.0 ml SDS (10 %)  
1.0 ml Glycerin  
0.5 ml Bromphenolblau (0.5 %)

Dem Probenpuffer wurde vor Verwendung  $\beta$ -ME (50  $\mu$ l·ml<sup>-1</sup>) zugesetzt.

Die Gelplatten wurden nach Herstellerangabe zusammengesetzt. Anschließend wurden die Lösungen (ohne APS und TEMED) für das Trenngel gemischt und mit Argon kurz begast. Nach Zusatz von APS und TEMED wurde die Mischung zwischen die Glasplatten gegossen (ca. 3.5 ml pro Gel) und mit Isopropanol überschichtet. Nach Abschluss der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel in derselben Weise wie zuvor das Trenngel gemischt und gegossen (ca. 1 ml pro Gel). Anschließend wurde der Probenkamm eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren der Gele wurden die Gelplatten nach Herstellerangaben in das Gerät eingesetzt und 1 x Elektrodenpuffer in die Kammern gefüllt. Dann wurde der Probenkamm entfernt und die entstandenen Gelkammern mit 1 x Elektrodenpuffer gespült. Die Proben wurden mit Probenpuffer (mit  $\beta$ -ME) versetzt und 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden sie 5 Minuten in Eis gekühlt und dann in die Gelkammern gefüllt. Vom Standard (Roti®-Mark Standard, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) wurden 5  $\mu$ l eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V (konstante Spannung). Das Färben des Gels erfolgte mit Hilfe des Colloidal Blue Stain-Kits. Es beruht auf der Eigenschaft von Coomassie Blau Proteine zu binden <sup>[102]</sup>.

Färbelösung: 55 ml Wasser, 20 ml Methanol, 5 ml Färbelösung B, 20 ml Färbelösung A.

Es wurde mindestens 1 h lang unter Schütteln gefärbt. Das Entfärben erfolgte mit Wasser über Nacht. Anschließend wurden die Gele in Cellophan verpackt und getrocknet.

#### 2.3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Als Gelkammer wurde die Mini Horizontal Submarine Unit HE 33 verwendet.

Folgende Lösungen und Puffer wurden für die DNA-Elektrophorese eingesetzt:

50 x Tris-Acetat-Essigsäure-Puffer (TAE):  
2.0 M Tris  
1.0 M Essigsäure  
0.1 M EDTA

6 x Ladungspuffer:  
30 % (v/v) Glycerin  
0.25 % (w/v) Bromphenolblau  
0.25 % (w/v) Xylencyanol

Der pH-Wert wurde auf 8.3 eingestellt.

Verdünnung des Standards:

50  $\mu$ l·ml<sup>-1</sup> 1 kb Plus DNA Ladder  
170  $\mu$ l·ml<sup>-1</sup> 6 x Ladungspuffer

Es wurden 5  $\mu$ l pro Lauf eingesetzt.

Agarose (0.5 g) wurde in 1 x TAE-Puffer (50 ml) suspendiert und durch Erwärmen in der Mikrowelle (3 Minuten, 600 W) gelöst. Es wurde Ethidiumbromid ( $1 \mu\text{l}$ ,  $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) zugeben. Nach Abkühlung auf  $50^\circ\text{C}$  wurde die Lösung in die Gelkammer gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Die Proben wurden mit dem Ladungspuffer versetzt ( $1 \mu\text{l}$  auf  $5 \mu\text{l}$  Probe) und in die Geltaschen des polymerisierten Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 20 Minuten. Anschließend wurde das Gel mit dem Geldokumentationssystem fotografiert.

#### 2.3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Auch hier wurde die Mini Horizontal Submarine Unit HE 33 verwendet.

Folgende Lösungen und Puffer wurden für die RNA-Elektrophorese benötigt:

10 x MOPS-Puffer:

200 mM MOPS

50 mM Natriumacetat-Trihydrat

10 mM EDTA

Der pH-Wert wurde mit 10 M NaOH auf 7 eingestellt. Es wurde DEPC-behandeltes Wasser (siehe 2.5.1) benutzt.

Denaturierungsreagens:

5.00  $\mu\text{l}$  10 x MOPS

8.75  $\mu\text{l}$  37 % Formaldehyd

25.0  $\mu\text{l}$  Formamid

10 x Ladungspuffer:

50 % (v/v) Glycerin

50 % (v/v) 10 mM EDTA pH 8.0

0.25 % (w/v) Bromphenolblau

0.25 % (w/v) Xylencyanol

Alle Teile der Gelapparatur wurden vor dem Benutzen mit 3 %-iger Wasserstoffperoxidlösung zur Inaktivierung von RNasen behandelt. Die Agarose (0.5 g) wurde in 1 x MOPS-Puffer (50 ml) suspendiert und durch Erwärmen in der Mikrowelle gelöst (3 min, 600 W). Nach Abkühlung auf  $65^\circ\text{C}$  wurden Ethidiumbromid ( $1 \mu\text{l}$ ,  $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) und Formaldehyd (2.5 ml, 37 %) zugegeben und das Gel gegossen. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Gel mindestens 30 Minuten im Kühlschrank gelagert. Die Proben wurden mit dem dreifachen Volumen Denaturierungsreagenz versetzt, 5 Minuten auf  $65^\circ\text{C}$  erhitzt und 5 Minuten im Eis gekühlt. Anschließend wurde die Probe mit 10 x Ladungspuffer versetzt und in die Gelkammern pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 60 V für 1 h. Danach wurde das Gel dokumentiert.

## 2.4 Kultivierung von *Wachendorfia thyrsiflora*-Wurzelkulturen

Zur Etablierung der Wurzelkulturen wurden sterile Samen bei  $22^\circ\text{C}$  auf festem MS-Medium gekeimt und bei Erreichen einer Wurzellänge von 2 cm in neues Medium überführt. Nach 12

Wochen hatte sich eine Wurzelaggregation gebildet, die mehrfach subkultiviert wurde und nach Erreichen einer Zellmasse von 4 g in flüssiges Medium überführt wurde <sup>[103]</sup>.

Die Wurzelkulturen wurden in 300 ml Weithals-Erlenmeyerkolben mit modifiziertem Murashige/Skoog-Medium M3 <sup>[104]</sup> auf Schütteln mit 90 rpm in einer Kulturkammer (24°C) kultiviert. Sie wurden alle vier Wochen geteilt und in frisches Medium überführt.

Zusammensetzung des Mediums M3:

Stammlösung 1 (ein Liter):

Makroverbindungen:

82.5 g Ammoniumnitrat  
95.0 g Kaliumnitrat  
18.5 g Magnesiumsulfat-heptahydrat  
8.5 g Kaliumdihydrogenphosphat

Mikroverbindungen:

310 mg Borsäure  
430 mg Zinksulfat-heptahydrat  
41.5 mg Kaliumiodid  
12.5 mg Natriummolybdat-dihydrat  
1.25 mg Kupfersulfat-pentahydrat  
1.25 mg Kobaltchlorid  
845 mg Mangansulfat-monohydrat

Stammlösung 2:

22.0 g·l<sup>-1</sup> Kalziumchlorid-dihydrat

Stammlösung 3:

1.866 g·l<sup>-1</sup> Dinatrium-EDTA  
1.330 g·l<sup>-1</sup> Eisensulfat-heptahydrat

Für einen Liter Medium M3 wurden benötigt:

Salze:

20 ml Stammlösung 1  
20 ml Stammlösung 2  
20 ml Stammlösung 3

Vitamine:

0.4 mg Vitamin B<sub>1</sub>  
2.0 mg NAA  
0.2 mg Kinetin  
80 mg *myo*-Inosit

Nährstoffe:

1.0 g Caseinhydrolysat  
30 g Saccharose

Das Medium wurde mit 1 M HCl auf pH 5.3 eingestellt, in 300 ml Erlenmeyer-Kolben à 100 ml abgefüllt und 20 Minuten bei 121°C autoklaviert.

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 Isolierung von Ribonukleinsäuren

#### 2.5.1.1 Herstellung von DEPC-Wasser

Bei der Arbeit mit RNA wurde das verwendete Wasser vor der Benutzung mit DEPC behandelt, um Ribonukleasen (RNasen) zu inaktivieren. Dazu wurde DEPC (1 ml) in Wasser (1 l) suspendiert und mindestens 3 h gerührt. Anschließend wurde das Wasser autoklaviert (20 min bei 121°C).

#### 2.5.1.2 RNA-Isolierung

Das Pflanzenmaterial (mind. 1 g) wurde mit flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend im Mörser zu einem Pulver verrieben. Das noch gefrorene Pulver wurde portionsweise in ein

15 ml Röhrchen mit Trizol (3 ml) gegeben und gemischt. Nach kompletter Zugabe wurde das Gemisch 10 min in Eis gekühlt. Es wurde  $\text{CHCl}_3$  (1.5 ml) zugegeben, 30 s geschüttelt und weitere 10 min gekühlt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei  $2500 \times g$ . Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und die  $\text{CHCl}_3$ -Extraktion wiederholt. Der erhaltene Überstand wurde mit Natriumcitrat (0.375 ml, 0.8 M), NaCl (0.375 ml, 1.2 M) und Isopropanol (0.75 ml) versetzt. Die F llung der RNA erfolgte bei  $4^\circ\text{C}$  für 4 h. Anschließend wurde 30 min bei 7500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit EtOH (0.5 ml, 75 % in DEPC-Wasser) in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt, 10 min gewaschen und 5 min bei  $8500 \times g$  zentrifugiert. Anschließend wurde das EtOH abpipettiert und der Waschvorgang wiederholt. Das Pellet wurde 10 min auf Eis an der Luft getrocknet und in DEPC-Wasser (800  $\mu\text{l}$ ) unter Erwärmung auf  $50^\circ\text{C}$  gelöst. Dann wurde über Nacht bei  $-20^\circ\text{C}$  mit Lithiumchloridlösung (200  $\mu\text{l}$ , 10 M) erneut die RNA präzipitiert. Es wurde bei  $42000 \times g$  45 min zentrifugiert und zweimal wie oben beschrieben mit 75 %-igem EtOH gewaschen. Das RNA-Pellet wurde in 150  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser gelöst.

#### *2.5.1.3 Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit*

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Eine optische Dichte (1 OD) entspricht  $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  RNA. Die Reinheit wurde durch das Verhältnis 260/280 nm bestimmt. Reine RNA zeigt ein Verhältnis von 1.9 - 2.1. Die RNA-Qualität wurde mittels Gelelektrophorese beurteilt (siehe 2.3.2.3).

#### 2.5.2 Synthese von cDNA

Aus der isolierten RNA wurde mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase ein komplementäres, einzelsträngiges cDNA-Molekül synthetisiert. Anschließend wurde die RNA durch die intrinsische RNaseH-Funktion der Reversen Transkriptase abgebaut.

Zur Synthese der cDNA wurde der 5/3'-RACE Kit und die mitgelieferte Anleitung des Herstellers verwendet. Als Primer für die Erststrangsynthese wurde der mitgelieferte oligo d(T)-anchor-Primer (5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTV-3', mit V=A, C oder G) benutzt.

#### 2.5.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Polymerasekettenreaktion <sup>[105]</sup> wurde folgender Standardansatz (20  $\mu\text{l}$ ) verwendet:

0.5  $\mu\text{l}$  zu amplifizierendes DNA-Fragment („Template“)

0.5  $\mu\text{l}$  Primer 1 ( $100 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ )

0.5  $\mu\text{l}$  Primer 2 ( $100 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ )

0.5  $\mu\text{l}$  dNTP's ( $10 \text{ nmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  pro dNTP)

0.5  $\mu\text{l}$  Taq-Polymerase ( $1 \text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ )

2.0  $\mu\text{l}$  Taq-Puffer

15.5  $\mu\text{l}$  Wasser

Die verwendeten Primer wurden in Anhang 2 aufgelistet. Einige dieser Primer waren degeneriert, d.h. Mischungen von Primern mit Variationen in bestimmten Positionen.

#### *Verwendetes Zyklusprogramm*

|                        |        |      |        |
|------------------------|--------|------|--------|
| Denaturierung:         | 5 min  | 95°C | ] 30 x |
| Denaturierung:         | 30 s   | 95°C |        |
| Anlagerung der Primer: | 30 s   | 50°C |        |
| Amplifikation:         | 1 min  | 72°C |        |
| Amplifikation:         | 10 min | 72°C |        |

#### 2.5.4 5'/3'-RACE

Diese Methode der schnellen Vervielfältigung von cDNA-Enden (rapid amplification of cDNA ends, RACE) wurde immer dann angewendet, wenn ein Bruchstück eines Genes bekannt war und der restliche Teil gesucht wurde. Es wurde auch hier der 5'/3'-RACE Kit der Firma Roche unter Verwendung der mitgelieferten Vorschrift verwendet.

Folgende Primer und Templates wurden genutzt:

3'-RACE: Als Template wurde die synthetisierte cDNA (2.5.2), als Primer für die PCR dhs06\_wdf3race (Enzym Wdf1) und dhs33\_wdf2\_3Race (Enzym Wdf2) sowie der oligo-d(T)-anchor-Primer (beide Enzyme) verwendet.

5'-RACE: Als Template wurde eine cDNA mit den Primern dhs07\_wdf5\_2 (Enzym Wdf1) und dhs32\_wdf2\_5RACE (Enzym Wdf2) neu synthetisiert. Für die PCR wurden der oligo-d(T)-anchor-Primer und die Primer dhs05\_wdf5race (Enzym Wdf1) bzw. dhs31\_wdf2\_5Race (Enzym Wdf2) genutzt.

#### 2.5.5 Reinigungsmethoden für DNA

Zur Reinigung von DNAs wurden zwei Verfahren eingesetzt:

1. High Pure PCR Product Purification Kit zur direkten Reinigung von PCR-Ansätzen unter Verwendung der mitgelieferten Anleitung. Eluiert wurde mit 10 mM Tris-HCl (30 µl, pH 8.0).
2. QIAquick Gel Extraction Kit zur Reinigung von Fragmenten aus Agarose-Gelen. Dazu wurde zunächst eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.3.2.2) durchgeführt. Das Gelfragment mit der interessierenden DNA-Bande wurde ausgeschnitten und gewogen. Anschließend wurde das im Protokoll des Herstellers beschriebene Verfahren angewendet. Die DNA wurde mit Puffer EB (50 µl) eluiert.



## 2.5.6 Klonierungsverfahren

### 2.5.6.1 Plasmide

pCR<sup>®</sup> II-TOPO<sup>®</sup>: Dieses Plasmid codiert Ampicillin- und Kanamycin-Resistenzen. Es enthält sowohl den pUC als auch den f1 origin (Ausgangspunkte der Replikation des Plasmides für Bakterien und f1-Phagen) sowie das *lacZ*-Gen mit dem *lac*-Promotor. Das Plasmid lag linearisiert mit zwei T-Überhängen vor. Die Ligation mit dem PCR-Produkt führte zu einem zyklischen Plasmid (siehe TOPO-TA-Cloning 2.5.6.4).

pHis8 (konstruiert von J. Noel, zur Verfügung gestellt von J. Schröder): Dieses Plasmid wurde benutzt, um 5'-terminale Codons für Histidin an das Gen anzuhängen und das Protein zu exprimieren. Es wurde der T7-Promotor verwendet, ein T7-Terminator wurde ebenfalls codiert. Das Plasmid enthielt ein Kanamycin-Resistenzgen. Außerdem enthielt das Plasmid eine Ribosomenbindungsstelle und einen *lac*-Operator sowie das *lacI*-Gen. Dies ermöglichte die Induktion der Proteinexpression mit IPTG (Isopropylthio- $\beta$ -galactosid).

### 2.5.6.2 Stämme

*E. coli* TOP10F<sup>'</sup> : '{*lacI*<sup>d</sup> Tn10 (Tet<sup>R</sup>)} *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ*M15  $\Delta$ *lacX*74 *recA1* *deoR* *araD*139  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1* *nupG*.

*E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL: B F *ompT* *hsdS*(*r<sub>b</sub><sup>-</sup> m<sub>b</sub><sup>-</sup>*) *dcm*<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> *gal*  $\lambda$ (DE3) *endA* Hte [*argU* *ileY* *leuW* Cam<sup>r</sup>].

### 2.5.6.3 Medien

LB-Medium:

10 g·l<sup>-1</sup> Pepton

10 g·l<sup>-1</sup> Hefeextrakt

5 g·l<sup>-1</sup> Natriumchlorid

Die Lösung wurde auf pH 7 eingestellt und 20 min bei 121°C autoklaviert. Für die Herstellung von Agar-Platten wurde dem Medium 1.5 % Agar zugesetzt. Bei Zugabe von Antibiotika zu Festmedium wurde das autoklavierte Medium zunächst auf 50°C gekühlt, bevor die Zugabe des Antibiotikums und das Gießen der Platten unter sterilen Bedingungen erfolgte.

TB-Medium:

12 g Pepton

24 g Hefeextrakt

4 ml Glycerin

wurden in 900 ml Wasser gelöst,

à 225 ml in 1 l-Kolben abgefüllt und autoklaviert.

10 x Phosphatpuffer:

0.17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0.72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

wurden in 100 ml Wasser gelöst

und autoklaviert.

Beim Ansetzen der Bakterienkultur wurden zu je 225 ml TB-Medium 25 ml 10 x Phosphatpuffer gegeben.

#### 2.5.6.4 TOPO-TA-Cloning<sup>®</sup>

Zur Vorbereitung der Klonierung wurde ein mit Taq-Polymerase amplifiziertes DNA-Fragment mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (siehe 2.5.5) gereinigt. Die Klonierung selbst erfolgte mit dem TOPO-TA-Cloning<sup>®</sup>-Kit unter Verwendung der bereitgestellten Vorschrift. Das Screening erfolgte durch Blau/Weiss-Selektion. Die erhaltenen weißen Kolonien (mit Insert) wurden einer Kolonie-PCR unterzogen. Dazu wurde etwas Zellmaterial in einem PCR-Ansatz (Primer M13forward und M13reverse) ohne Template suspendiert und die erste Denaturierungsphase auf 20 min 95°C verlängert. Eine Analyse durch DNA-Elektrophorese (siehe 2.3.2.2) zeigte anschließend, ob das enthaltene Insert die korrekte Länge aufwies. Die Plasmide von blaugefärbten Kolonien enthielten kein Insert.

Klonierungsansatz:

2.0 µl gereinigtes PCR-Produkt

0.5 µl Salzlösung

0.5 µl Vektor pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>

Dieser Ansatz wurde 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden der Ansatz (2 µl) mit kompetenden *E. coli* TOP10F' (25 µl) vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 30 s. Danach wurde der Ansatz in Eis gekühlt und mit SOC-Medium (125 µl) versetzt. Diese Mischung wurde 1 h bei 37°C und 200 rpm geschüttelt und anschließend auf ampicillinhaltige (50 µg·ml<sup>-1</sup>) LB-Agarplatten ausplattiert. Diese Platten wurden zuvor mit X-Gal (40 µl, 40 mg·ml<sup>-1</sup> in DMF) und IPTG (40 µl, 100 mM in Wasser) behandelt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 2.5.6.5 Klonierung in den Expressionsvektor pHis8

Zunächst wurde eine PCR durchgeführt, bei der Primer verwendet wurden, die um die benötigten Restriktionsschnittstellen verlängert worden waren.

Folgende Primerkombinationen wurden für die einzelnen Gene verwendet:

*wdf1*: dhs20\_wdf\_chs1\_Bam und dhs21\_wdf\_chs1\_Hind,

*wdf2*: dhs34\_wdf\_chs2\_B und dhs35\_wdf\_chs2\_H,

*wdf3*: dhs36\_wdf\_chs3\_H und dhs37\_wdf\_chs3\_B.

Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden in den Vektor pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> (siehe oben) kloniert. Nachdem größere Mengen des erhaltenen Plasmidkonstruktes gereinigt worden waren (Minipräparation, 2.5.8), wurden diese sowie das Plasmid pHis8 mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII geschnitten (2.5.7). Die Fragmente wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (siehe 2.5.5) gereinigt. Die Menge an gereinigter DNA wurde mit einem Standard (Low DNA Mass Ladder) im Gel abgeschätzt.

**Ligationsansatz:**

30 ng Insert

10 ng Vektor

4.0 µl Puffer

1.0 µl Ligase auf 20 µl

Der Ansatz wurde 1 h bei 24°C inkubiert. Das entstandene Vektorkonstrukt (5 µl) wurde mit *E. coli* TOP10F' (25 µl) vermischt und anschließend wie beim TOPO-TA-Cloning, allerdings unter Verwendung von kanamycinhaltigen LB-Agarplatten (ohne X-Gal und IPTG) zur Selektion, verfahren. Mit Hilfe der Minipräparation (2.5.8) wurde das Vektorprodukt isoliert und anschließend wie folgt in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL umklont:

Kompetente *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (30 µl) und β-ME (2 µl, mitgelieferte Lösung wurde 1:10 verdünnt) wurden 10 min auf Eis inkubiert und dabei alle 2 min gemischt. Der Vektor (3 µl) wurden zugegeben und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 20 sec und anschließende Abkühlung im Eis. Die Bakterien wurden 1 h bei 37°C geschüttelt (200 rpm) und anschließend auf Platten mit Kanamycin und Chloramphenicol (je 50 µg·ml<sup>-1</sup>) ausplattiert. Es wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden durch Kolonie-PCR (Primer pHis8\_for und pHis8\_rev) und Sequenzierung auf das Vorhandensein des korrekten Plasmidkonstruktes getestet.

2.5.7 Restriktionsanalysen

Es wurden folgende Restriktionsendonukleasen mit diesen Schnittstellen verwendet:

|               |          |                 |          |
|---------------|----------|-----------------|----------|
| <i>Bam</i> HI | G↓GATCC, | <i>Hind</i> III | A↓AGCTT, |
| <i>Dpn</i> I  | GA↓TC,   | <i>Eco</i> RI   | G↓AATTC. |

**Restriktionsansatz:**

1.0 µl zu spaltende DNA

0.5 µl Enzym

1.0 µl Puffer

7.5 µl H<sub>2</sub>O

Dieser Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Bei präparativer Arbeit (z.B. für Ligationsansätze) wurde das Ansatzvolumen auf 20 µl und die Menge an eingesetzter DNA auf 5 µl erhöht. Zur Verwendung von *Dpn* I siehe 2.5.11 (Mutagenese).

2.5.8 Minipräparationen

Für die Isolierung von Plasmid-DNA in kleinen Mengen wurde ein modifiziertes Protokoll nach Sambrook verwendet<sup>[106]</sup>. Dafür wurde eine Übernachtskultur (1.5 ml) 5 min bei 15000 x g abzentrifugiert und das Medium entfernt. Das Zellpellet wurde in Lösung I (200 µl) resuspendiert. Es wurde Lösung II (300 µl) zugeben, das Reaktionsgefäß zur Mischung mehrfach vorsichtig gekippt und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Dieser Schritt wurde

nach Zugabe von Lösung III (300 µl) wiederholt. Das entstandene Proteinpräzipitat wurde 15 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurde zweimal mit Chloroform (400 µl) extrahiert, durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol die DNA gefällt und 20 min bei 15000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser (20 µl) aufgenommen. Es schloß sich eine zweite Fällung (mindestens 20 min 4°C) mit Polyethylenglycol ( $M_r = 8000$ , 40 µl, 13 %-ige Lösung in Wasser) und NaCl (8 µl, 4 M) an. Das Pellet wurde nach 15 min Zentrifugation (15000 x g), Waschen mit 70 %-igem Ethanol und Trocknung in Wasser (20 µl) gelöst. Außerdem wurde das Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Es nutzt dasselbe Prinzip. Zur Aufreinigung und Konzentrierung der DNA nach dem Entfernen der Proteine wurde eine spezielle mitgelieferte Säule verwendet.

Verwendete Lösungen:

|                                |                       |                            |
|--------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| Lösung I:                      | Lösung II:            | Lösung III:                |
| 50 mM Glucose                  | 0.2 M Natriumhydroxid | 60.0 ml Kaliumacetat (5 M) |
| 25 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8.0) | 1 % (w/v) SDS         | 11.5 ml Eisessig           |
| 10 mM EDTA (pH 8.0)            |                       | 28.5 ml Wasser             |

## 2.5.9 Phagenbibliothek

### *2.5.9.1 Stämme*

*E. coli* NM522: *supE*, *thi*,  $\Delta(hsdMS-mcrB)5$ ,  $\Delta(lac-proAB)$ ,  $F[proAB, lacI^q, lacZ\Delta M15]$ . Dieser Stamm wurde auf M9-Minimalmediumplatten gehalten. Die Anzucht erfolgte in LB-Medium (37°C).

*E. coli* NP66: *thr*, *leu*, *pro*, *thi*, *bio*,  $ct^{857}int^-xis^-$ ,  $\Delta H1$ , *lacZ* $\Delta M15$ ,  $cm^R/pJN13$  [ $\Phi 80$  repressor, pACYC184 replicon]/pXis [*xis*<sup>+</sup>, *str*<sup>R</sup>, *spec*<sup>R</sup>, pSC101 replicon].

Zur Anzucht von der Platte (LB) oder Glycerinkultur wurde 2 x YT-Medium (32°C) mit 50 µg·ml<sup>-1</sup> Spectinomycin, 30 µg·ml<sup>-1</sup> Chloramphenicol und 0.2 % (w/v) Maltose benutzt.

Phage bzw. Phagemid  $\lambda$ ExCell *Not I/Eco RI*/CIP: Der Bakteriophage war insgesamt 45.5 kb groß und in der Lage bei Infektion von *E. coli* NP66 ein 4190 bp großes Phagemid (mit Ampicillinresistenz, den Replikationsursprüngen pUC ori und f1 ori sowie dem *lacZ* Gen) freizusetzen. Dazu erfolgte eine ortsspezifische Rekombination zwischen den Stellen *attL* und *attR*. Die dazu nötigen Enzyme wurden von *E. coli* NP66 geliefert.

### *2.5.9.2 Medien*

NZY:

- 5 g·l<sup>-1</sup> Natriumchlorid
- 2 g·l<sup>-1</sup> Magnesiumsulfat-heptahydrat
- 5 g·l<sup>-1</sup> Hefeextrakt
- 10 g·l<sup>-1</sup> NZ-Amin

Die Lösung wurde auf pH 7.5 eingestellt. Für Agar-Platten wurde Agar ( $15 \text{ g l}^{-1}$ ), für Top-Agar-Platten Agarose [0.7 % (w/v)] zugefügt.

LB: siehe 2.5.6.3

M9-Minimalmediumplatten:

|  |  |
|--|--|
| 5 x Salzlösung:  | Für das Medium wurden bei 50°C gemischt:                   |
| $64.0 \text{ g l}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ | 777 ml Agarlösung (1.5 % in Wasser)                        |
| $42.5 \text{ g l}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$                               | 200 ml 5 x Salzlösung                                      |
| $15.0 \text{ g l}^{-1} \text{NaCl}$  | 20 ml Glucoselösung (20 %)                                 |
| $5.0 \text{ g l}^{-1} \text{NH}_4\text{Cl}$                                  | 2 ml Magnesiumsulfatlösung (1M)                            |
|  | 1 ml Thiaminlösung ( $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) |

Die Glucose- und die Thiaminlösung wurden zuvor sterilfiltriert, die anderen Lösungen autoklaviert. Anschließend wurde die Lösung steril in Petrischalen gegossen.

2 x YT:

$10 \text{ g l}^{-1} \text{NaCl}$   
 $10 \text{ g l}^{-1}$  Hefeextrakt  
 $16 \text{ g l}^{-1}$  Trypton

Die Lösung wurde auf pH 7.5 eingestellt.

#### 2.5.9.3 Puffer

|                                       |   |   |
|---------------------------------------|---|---|
| 20 x SSC:                             | SM:   | NZCYM:  |
| $175.3 \text{ g l}^{-1} \text{NaCl}$  | $5.8 \text{ g l}^{-1} \text{NaCl}$                                | $10 \text{ g l}^{-1}$ NZ-Amin                                   |
| $88.2 \text{ g l}^{-1}$ Natriumcitrat | $2.0 \text{ g l}^{-1} \text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ | $5 \text{ g l}^{-1} \text{NaCl}$                                |
|                                       | $50 \text{ ml l}^{-1}$ Tris-HCl-Puffer (1 M, pH 7.5)              | $5 \text{ g l}^{-1}$ Hefeextrakt                                |
|                                       | $5 \text{ ml l}^{-1}$ Gelatine (2 % (w/v))                        | $1 \text{ g l}^{-1}$ Caseinhydrolysat                           |
|                                       |   | $2 \text{ g l}^{-1} \text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ |

Die Puffer 20 x SSC und NZCYM wurden auf pH 7 eingestellt.

#### 2.5.9.4 Amplifikation der Primärbank

Die Primär-cDNA-Bank wurde von der Firma vertis Biotechnologie AG, Freising hergestellt. Dazu wurde die von uns gelieferte RNA zunächst in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde nach ihrer Größe fraktioniert und anschließend gerichtet in den Lambda-Phagen pExCell kloniert. Dann wurde die Ligation verpackt und es folgte die Transfektion in den Stamm *E. coli* NM522. Es wurde 1 ml Phagenlösung mit  $220 \text{ pfu} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  (pfu-plaque forming units, Plaques bildende Einheiten) geliefert. Diese wurden zunächst amplifiziert. Dazu wurde Phagenlösung (23  $\mu\text{l}$ ) mit *E. coli* NM522 (600  $\mu\text{l}$ , OD = 0.5 in 10 mM  $\text{MgSO}_4$ ) suspendiert und 15 min bei 37°C inkubiert. Diese Mischung wurde mit NZY-Topagar (6.5 ml, 50°C) vermischt und auf eine Petrischale ( $\varnothing$  14.5 cm) mit NZY-Agar gegossen. Nach dem Erstarren wurden die Platten 7 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde auf die Platten SM-Puffer (8 ml) gegeben und über Nacht bei 4°C geschwenkt. Am nächsten Tag wurde der SM-Puffer abgegossen, nochmals mit Puffer (2 ml) gespült und die vereinigten Lösungen mit Chloroform

(Endkonzentration: 5 % v/v) versetzt. Die SM-Pufferlösungen wurden 10 min bei 500 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und der Extraktionsvorgang mit  $\text{CHCl}_3$  wiederholt. Anschließend wurde die Lösung durch einen 0.45  $\mu\text{m}$ -Filter filtriert. Ein Teil der erhaltenen Lösung wurde zur langfristigen Lagerung mit DMSO (Endkonzentration: 7 % v/v) versetzt und bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Zum Rest wurde Chloroform (Endkonzentration: 0.3 % v/v) gegeben und die Lösung bei  $4^\circ\text{C}$  gekühlt. Mit Hilfe von Verdünnungsreihen wurde der Titer der erhaltenen Bank bestimmt.

#### 2.5.9.5 Untersuchung („Screening“) der cDNA-Bank

Für das Screening der Bank wurden pro Petrischale ( $\varnothing$  14.5 cm) jeweils 10000 pfu verwendet. Nach dem Ende der Inkubation (2.5.9.4, 7 h) wurden die Platten ca. 0.5 h bei  $4^\circ\text{C}$  gekühlt. Anschließend wurden HybondN<sup>+</sup>-Membranen auf die Oberfläche der Platte gelegt und abgezogen. Wurde dieser Vorgang mit einer zweiten Membran wiederholt, betrug die Auflagezeit 2 min. Die Membranen wurden 2 h bei  $80^\circ\text{C}$  erhitzt und anschließend mit ultraviolettem Licht (2 x 2 min, UV-Linker) behandelt. Die Membranen wurden 2 x 10 min mit 2 x SSC (mit 0.1 % (w/v) SDS) prähybridisiert.

Zur Herstellung der radioaktiv markierten Sonde wurde das interessierende DNA-Fragment durch PCR (2.5.3) amplifiziert, aus dem Gel gereinigt (2.5.5) und die DNA-Menge mit einem Standard (Low DNA Mass Ladder) im Gel abgeschätzt. Das gereinigte PCR-Produkt in Wasser (25 ng, Gesamtvolumen 45  $\mu\text{l}$ ) wurde 3 min auf  $95^\circ\text{C}$  erhitzt, im Eis abgekühlt und zu einem „Ready-to-go DNA labelling bead“ gegeben. Dazu kam [ $^{32}\text{P}$ ]dCTP (5  $\mu\text{l}$ ). Diese Mischung wurde 20 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend über eine Säule (ProbeQuant G-50 micro columns, Durchführung lt. Herstellerprotokoll) aufgearbeitet. Vor der Zugabe zu den Membranen wurde die Sonde (5  $\mu\text{l}$  verdünnt in 45  $\mu\text{l}$  Wasser) nochmals bei  $95^\circ\text{C}$  denaturiert. Die Membranen wurden in eine Schüssel mit Hybridisierungspuffer (25 - 50 ml, Carl Roth GmbH & Co. KG) gelegt und dazu die markierte Sonde (25  $\mu\text{l}$ ) pipettiert. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei  $58^\circ\text{C}$  oder  $48^\circ\text{C}$  geschwenkt. Am nächsten Tag wurde der Hybridisierungspuffer abgegossen und zweimal 5 min mit 2 x SSC (0.1 % SDS) gewaschen, bis die Radioaktivität der Membran unter 100 cts $\cdot\text{cm}^{-2}$  lag. Die Membranen wurden auf mit Folie bespannte benutzte Filme gelegt und mit Folie bedeckt. Dieses Paket wurde mit einem Röntgenfilm über Nacht bei  $-80^\circ\text{C}$  exponiert und dann in einer Filmentwicklungsmaschine entwickelt. Nach der Zuordnung der Petrischalen zu den Signalen auf dem Film wurden interessierende Spots mit sterilen Pasteurpipetten ausgestochen und das Agarstück in SM-Puffer (500  $\mu\text{l}$ ) überführt. Dazu wurde Chloroform (20  $\mu\text{l}$ ) pipettiert. Zumeist war es nötig, mit den gepickten Phagen ein zweites Screening durchzuführen. Dazu wurde der SM-Puffer 1:1000 verdünnt und diese Verdünnung (5  $\mu\text{l}$ ) mit *E. coli* NM522 (100  $\mu\text{l}$ ) und Topagar (2.5

ml) auf Petrischalen (Ø 9 cm) mit NZY-Agar aufgebracht. Die Anzahl der erhaltenen Plaques schwankte hierbei zwischen 20 und 150.

#### 2.5.9.6 Freisetzung („in vivo excision“) des Plasmids

Obwohl es möglich war, mit den Phagen selbst PCRs durchzuführen (2.5.3; Primer M13f und M13r), erforderte das Sequenzieren das Vorhandensein von gereinigter DNA, z.B. in Form von zirkulären Phagemiden. Dazu musste der Phage pExCell im Stamm *E. coli* NP66 amplifiziert werden. Nach der Infektion der *E. coli*-Zellen wurde der  $\lambda$ -Phage durch Zellenzyme in einzelne Teile gespalten und diese zu Phagemiden zirkularisiert. *E. coli* NP66 wuchs über Nacht (32°C, 220 rpm) in 2 x YT [50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Spectinomycin, 30  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Chloramphenicol, 0.2 % (w/v) Maltose]. Diese Übernachtskultur (50  $\mu\text{l}$ ) wurde in frisches Medium (5 ml) überführt und wuchs bei 32°C auf OD<sub>600</sub> von 0.5 - 0.8. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in NZCYM mit 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Spectinomycin resuspendiert (OD<sub>600</sub> = 2). Die *E. coli* (100  $\mu\text{l}$ ) wurden in 15-ml-Röhrchen 20 min bei 39°C geschüttelt, die Phagenlösung (100  $\mu\text{l}$ ) hinzugefügt und weitere 20 min bei 39°C inkubiert. Dann wurde Natriumcitrat (200  $\mu\text{l}$ , 1 M, 22°C) zugegeben, um die Infektion der Bakterien durch die Phagen zu stoppen. Es wurde vorgewärmtes 2 x YT (5 ml, 32°C) zugefügt und die Kultur 1.5 h bei 32°C geschüttelt. Ein Teil dieser Kultur (50  $\mu\text{l}$ ) wurde auf LB-Platten mit 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Phagen-DNA konnte anschließend in einer Minipräparation (2.5.8, 3 ml Kulturvolumen) gereinigt werden.

#### 2.5.10 Sequenzierung

Der Big-Dye hatte folgende Zusammensetzung:

2.5 % MgCl<sub>2</sub>

Polymerase-Buffer

AmpliTaQ DNA Polymerase FS

Desoxynucleosidtriphosphate (dNTP)

Didesoxynucleosidtriphosphate (ddNTP) mit Fluoreszenzfarbstoffen

Zur Markierung von Didesoxyguanin wurde dR110, von Didesoxyadenin dR6G, von Didesoxythymine dTamra und vom Didesoxycytosin dRox als Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt.

Sequenzierungsansatz:

2  $\mu\text{l}$  Big Dye

1  $\mu\text{l}$  Minipräparation

1  $\mu\text{l}$  Primer (10 pmol  $\mu\text{l}^{-1}$ )

6  $\mu\text{l}$  Wasser

PCR:

Denaturierung: 5 min 96°C

Denaturierung: 10 s 96°C

Anlagerung der Primer: 20 s 55°C

Amplifikation: 4 min 60°C

34 x

Die fertigen Ansätze wurden anschließend mit DyeEx Spin Kit-Säulen gereinigt.

#### 2.5.11 Mutagenese

Um die Mutation eines Stop-Codons in *wdf3* zu Glutamin durchzuführen, wurde folgendes Protokoll benutzt.

**Mutationsansatz:**

|       |   |
|-------|---|
| 1 µl  | Minipräparation der <i>wdf3</i> -DNA mit dem Stop-Codon (1:10 verdünnt) |
| 2 µl  | <i>wdf3_mut2_for</i> (10 pmol·µl <sup>-1</sup> )                        |
| 2 µl  | <i>wdf3_mut2_rev</i> (10 pmol·µl <sup>-1</sup> )                        |
| 1 µl  | dNTP's  |
| 1 µl  | PfuTurbo DNA Polymerase   |
| 5 µl  | PfuTurbo-Puffer   |
| 38 µl | Wasser  |

**PCR:**

|                        |       |      |        |
|------------------------|-------|------|--------|
| Denaturierung:         | 30 s  | 95°C | ] 16 x |
| Denaturierung:         | 30 s  | 95°C |        |
| Anlagerung der Primer: | 60 s  | 55°C |        |
| Amplifikation:         | 5 min | 68°C |        |

Anschließend wurde *Dpn* I-Restriktionsendonuklease (1 µl) zugefügt und 1 h bei 37°C inkubiert, um methylierte Ausgangs-DNA abzubauen. Dann erfolgte mit dem Ansatz (1 µl) ein TOPO-TA-Cloning<sup>®</sup> (2.5.6.4). Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung nachgewiesen.

## **2.6 Biochemische Methoden**

### 2.6.1 Proteinexpression

Die *E. coli* BL 21-Zellen, die nachweislich das Plasmidkonstrukt mit dem Insert enthielten, wurden wie folgt exprimiert. Die Zellen wurden über Nacht in LB-Medium (2.5.6.3) mit Chloramphenicol und Kanamycin (je 50 µg·ml<sup>-1</sup>) und anschließend in TB-Medium (2.5.6.3; Start-OD<sub>600</sub>: 0.06) mit 10 x Phosphatpuffer und den Antibiotika auf OD<sub>600</sub> von 0.6 - 0.8 (ca. 3.5 h, 37°C, 220 rpm) gezogen. Dann wurden die Zellen im Wasserbad auf RT abgekühlt und mit IPTG (0.5 mM) bei 22°C und 220 rpm 3 - 4 h induziert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4000 x g, 10 min), in Phosphatpuffer (25 mM, 150 mM NaCl, pH 7.4) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde bei -80°C tiefgefroren.

### 2.6.2 Zellaufschluss

Die Zellen von 750 ml Kulturvolumen wurden im Aufschlusspuffer resuspendiert und anschließend mit einer French Press zweimal aufgeschlossen. Dann wurde 20 min bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand enthielt die exprimierten Proteine.

**Aufschlusspuffer:**

|         |  |
|---------|--|
| 25 ml   | Startpuffer (2.6.3)                        |
| 400 µl  | RNase (1 mg·ml <sup>-1</sup> )             |
| 2 mg    | DNase                                      |
| 4.3 mg  | Phenylmethylsulfonylfluorid in 240 µl DMSO |
| 6.25 µl | β-ME                                       |



### 2.6.3 Reinigung der Proteine durch Metallchelatchromatographie

Die Säule (HiTrap<sup>®</sup> Chelating Columns, 1 ml) wurde zunächst mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde Nickelsulfat (1 ml, 0.1 M) auf die Säule geladen und nichtgebundenes Salz mit Wasser abgewaschen. Dann wurde die Säule mit Startpuffer (10 ml) äquilibriert. Der Rohextrakt wurde auf die Säule geladen und diese mit Startpuffer (15 ml) gewaschen. Es folgte die schrittweise Elution mit Puffern, die 80, 150 und 500 mM Imidazol enthielten.

8 x Phosphatpuffer:

1.42 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

1.11 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

23.38 g NaCl

wurden in 100 ml gelöst und auf pH 7.4 eingestellt.

| Puffer:   | 8 x Phosphatpuffer: | Imidazol (2 M, pH 7.4): |
|---|---------------------|-------------------------|
| 50 ml Startpuffer   | 6.25 ml             | 0.5 ml                  |
| 10 ml 80 mM Imidazolpuffer                                      | 1.25 ml             | 0.4 ml                  |
| 10 ml 150 mM Imidazolpuffer                                     | 1.25 ml             | 0.75 ml                 |
| 10 ml 500 mM Imidazolpuffer                                     | 1.25 ml             | 2.5 ml                  |
| Allen Puffern wurde vor Benutzung $\beta$ -ME (3 mM) zugesetzt. |                     |                         |

### 2.6.4 Gelfiltration

Zur Entfernung des Imidazols und Reduktion der hohen Natriumchloridkonzentration wurde nach der Metallchelatchromatographie eine Gelfiltration durchgeführt. Dazu wurden Sephadex<sup>TM</sup> G-35M-Säulen verwendet. Die Säulen wurden mit Proteinpuffer (25 ml) äquilibriert. Anschließend wurde die Probe aufgetragen und in Fraktionen (0.5 ml) mit Proteinpuffer eluiert. Das Vorhandensein von Protein wurde durch Messung der UV<sub>280</sub>-Absorption nachgewiesen. Fraktionen mit hoher Absorption ( $\text{OD}_{280} > 3$ ) wurden vereinigt, portionsweise in flüssigem Stickstoff gekühlt und bei -80°C gelagert.

Proteinpuffer:

100 mM Hepes-KOH-Puffer, pH 7.0

100 mM Natriumchlorid

10 % Glycerin

2 mM Dithiothreitol (DTT)

### 2.6.5 Bestimmung der Proteinkonzentration und -reinheit

Die Proteinkonzentration wurde während einer Reinigung zunächst grob ermittelt, indem die UV<sub>280</sub>-Absorptionen der einzelnen Fraktionen bestimmt wurden. Zur exakten Konzentrationsbestimmung wurde eine modifizierte Methode nach Bradford<sup>[107]</sup> verwendet. Dazu wurde der Bio-Rad Proteinassay verwendet. Es wurde mit Albumin als Standard im Microassay-Verfahren gemessen. Die Probe wurde in Wasser (Gesamtvolumen 800  $\mu\text{l}$ ) verdünnt, der Proteinassay (200  $\mu\text{l}$ ) zugegeben und gemischt. Nach 30 min wurde die

Absorption bei 595 nm gegen eine Kontrollprobe ohne Protein gemessen. Die Reinheit einer Proteinprobe wurde durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2.3.2.1) bestimmt.

### 2.6.6 Messung von Enzymaktivitäten

Polyketidsynthase-Aktivitäten wurden durch den Einbau von radioaktivem [2-<sup>14</sup>C]Malonyl-CoA nachgewiesen.

Dazu wurde folgender 100 µl Standardtest verwendet:

50 µM Starter-CoA

80 µM [2-<sup>14</sup>C]Malonyl-CoA

3 µl Protein lösung (ca. 3 mg · ml<sup>-1</sup>)

Verdünnung des Malonyl-CoA zum Erreichen der folgenden Endkonzentrationen:

0.32 mM: 100 µl [<sup>12</sup>C]Malonyl-CoA (0.3 mM), 40 µl [<sup>14</sup>C]Malonyl-CoA, 13 µl Wasser

1.6 mM: 50 µl [<sup>12</sup>C]Malonyl-CoA (4.0 mM), 40 µl [<sup>14</sup>C]Malonyl-CoA, 47 µl Wasser

1.65 mM: 50 µl [<sup>12</sup>C]Malonyl-CoA (4 mM), 100 µl [<sup>14</sup>C]Malonyl-CoA

[<sup>14</sup>C]Malonyl-CoA wurde mit einer spezifischen Aktivität von 53 mCi-mmol<sup>-1</sup> und einer Konzentration von 0.025 mCi · ml<sup>-1</sup> geliefert. Die Verdünnung mit einer Endkonzentration von 1.65 mM wurde eingesetzt, um Produkte auch von den Substraten nachzuweisen, bei denen die Aktivität der Enzyme sehr gering ist. Zum Lösen der Starter-CoA-Ester wurde Wasser, pH 3.5 verwendet. Als Testpuffer wurde 0.1 M HEPES-KOH-Puffer, pH 6.85 benutzt. Die Standard-Reaktionstemperatur betrug 37°C und die Reaktionszeit 30 min. Diese Parameter wurden je nach Aufgabenstellung variiert. Zur Bestimmung von Enzymprodukten wurden mehrere Reaktionen gleichzeitig mit nicht-markiertem Malonyl-CoA durchgeführt und gepoolt. Nach erfolgter Reaktion wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 200 µl Ethylacetat und sofortiger Durchmischung abgestoppt. Es wurde 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert und 160 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion des Enzymsatzes wurde wiederholt, wobei beim zweiten Mal 200 µl Ethylacetat überführt wurden. Die Extrakte wurden mit einer Speedvac zur Trockne eingengt und anschließend in 20 µl Methanol aufgenommen. Davon wurden 15 µl zur HPLC-Analyse verwendet.

## **2.7 Nachweismethoden**

### 2.7.1 Kernmagnetische Resonanz (NMR)-Spektroskopie

#### *2.7.1.1 Spektrometer, Probenköpfe, Peripheriegeräte*

Bruker Avance DRX 500 NMR Spektrometer ausgerüstet mit einer CryoPlatform<sup>TM</sup>, <sup>1</sup>H-Resonanzfrequenz 500.13 MHz, <sup>13</sup>C-Resonanzfrequenz 125.75 MHz. Probenköpfe: Cryo-TXI

5 mm für isolierte Proben aus Enzymassays, Cryo-SEI 3 mm für isolierte Proben aus Enzymassays bzw. mit Cryofit<sup>TM</sup> für online-NMR-Messung der mittels SPE gesammelten Proben aus Enzymassays. Die HPLC-Festphasenextraktions-NMR (HPLC-Solid Phase Extraction (SPE)-NMR) erfolgte mit einem HP 1100 HPLC-System mit einem J&M PDA-Detektor und Sammeln der Proben auf Kartuschen mit Hilfe eines Prospekt 2-Gerätes (Spark Holland BV, Emmen, Niederlande). Bruker Avance 400 NMR Spektrometer: <sup>1</sup>H-Resonanzfrequenz 400.13 MHz, <sup>13</sup>C-Resonanzfrequenz 100.62 MHz. Probenkopf: ATM-Breitband-Probenkopf 5 mm.

#### 2.7.1.2 Lösungsmittel und Referenzierung

Es wurden deuterierte Lösungsmittel mit Deuteriumgehalt > 98% verwendet. Die Referenzierung auf  $\delta_{1H} = 0$  bzw.  $\delta_{13C} = 0$  erfolgte mit TMS als internem Standard bzw. bei HPLC-SPE-NMR-Kopplung auf das Lösungsmittelsignal (Aceton-*d*<sub>6</sub>  $\delta_{1H} = 2.04$ ).

#### 2.7.1.3 NMR-Methoden

<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, APT, DEPT-135, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C COSY, gHMBC, gHMQC unter Verwendung von Bruker Standard-Pulssequenzen. Unterdrückung der restlichen <sup>1</sup>H-Lösungsmittel-Signale von HDO und Aceton-*d*<sub>6</sub> bei der HPLC-SPE-NMR-Kopplung mittels Vorsättigung.

### 2.7.2 Massenspektrometrie

#### 2.7.2.1 Massenspektren von Syntheseprodukten

Zur Messung der Syntheseprodukte wurde ein MasSpec sector field-Massenspektrometer (Waters, Manchester, UK) mit einem direkten Insertionsprobenkopf verwendet. Es wurde die Methode der Elektronenstoß-Massenspektrometrie (EI-MS) im positiven Modus (70 eV) benutzt.

#### 2.7.2.2 Massenspektren von Enzymprodukten

Die Bestimmung von Enzymprodukten erfolgte durch ESI-MS mit einem Micromass Quattro II-Tandem Quadrupol-Massenspektrometer (Waters, Manchester, UK, Geometrie: Quadrupol-Hexapol-Quadrupol) mit einer Elektrosprayquelle (ESI). Die Spannungen an den Kapillaren und Düsen waren im positiven ESI-Modus -3.0 kV und 25 V, im negativen Modus 4.0 kV und -15 V. Der Stickstofffluss zur Zerstäubung betrug 15 l·h<sup>-1</sup>, zur Trocknung 250 l·h<sup>-1</sup>. Die Quelle und die Elektrospray-Kapillare wurden auf 60°C bzw. 150°C geheizt. Das Massenspektrometer wurde im konventionellen Scanning-Modus unter Verwendung des ersten Quadrupols betrieben. Vollständige Scans wurden im Bereich von *m/z* 90 - 450 mit einer Scanzeit von 1.5 s durchgeführt. Die Proben (1.5 µl) wurden als wässrige Methanollösungen mit Hilfe eines automatischen Probengebers injiziert. Zur Separation

wurde eine Nucleodur 100-3 C18-Säule (100 mm x 1 mm, 3  $\mu\text{m}$ , Macherey-Nagel, Düren, D) verwendet. Der Säulenausgang war direkt über eine „Fused-Silica“-Kapillare (0.75 m x 0.075 mm) mit einer Elektrospray-Quelle mit Z-Geometrie (Micromass, Waters, Manchester, UK) verbunden. Abhängig von der untersuchten Verbindung wurden verschiedene isokratische Elutionssysteme von Wasser und Methanol benutzt. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0.05  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  für 20 min. Die Temperaturen der Säule und der „Fused-Silica“-Kapillare wurden nicht reguliert.

### 2.7.2.3 Massenspektren von Proteinfragmenten

Um zu kontrollieren, inwiefern die exprimierten Proteine korrekt translatiert wurden, wurden sie mit Hilfe der Massenspektrometrie genauer untersucht. Dazu wurde zunächst eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.3.2.1) durchgeführt. Die Proteine wurden mit Coomassie gefärbt und die interessanten Banden ausgeschnitten. Diese Banden wurden anschließend dreimal mit Wasser, zweimal mit Ammoniumbicarbonat-Lösung (50 mM) und in Ammoniumbicarbonat-Lösung (50 mM in 50% Acetonitril) gewaschen. Die Gelstücke wurden im Stickstoffstrom getrocknet und in Ammoniumbicarbonat (20  $\mu\text{l}$ , 50 mM, pH 8.0) gequollen. Die Proteine wurden mit Trypsin oder GluC über Nacht bei 37°C verdaut.

Zur Untersuchung der Peptide mit ESI-MS wurden die Peptide aus den Gelstücken extrahiert und 6  $\mu\text{l}$  in ein CapLC-Gerät (Micromass, Manchester, UK) eingespritzt. Zunächst wurden die Peptide durch eine C18-Kartusche (300  $\mu\text{m} \times 5 \text{ mm}$ , Dionex GmbH, Idstein, D) mit einer Flussrate von 20  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$  5 min entsalzt. Anschließend wurden sie auf einer PepMap<sup>TM</sup>-Säule (75  $\mu\text{m} \times 15 \text{ cm}$ , 3  $\mu\text{m}$  C18 100 Å, Dionex GmbH, Idstein, D) mit folgendem Gradienten getrennt: 0 - 5 min 100 % A, 5 - 25 min 5 - 60 % B, 25 - 40 min 60 - 95 % B. Dabei bedeutet A: 5 % Acetonitril / 95 % Ameisensäure (0.1 %-ig) und B: 95 % MeCN/ 5 % Ameisensäure (0.1 %-ig). Die Flussrate betrug 300  $\text{nl}\cdot\text{min}^{-1}$ . Die getrennten Peptide wurden in einem an die LC gekoppelten Massenspektrometer Q-TOF 2 (Micromass, Manchester, UK) mit einer modifizierten Nano-ESI-Quelle (New Objective, Cambridge, MA, USA) massenspektrometrisch untersucht (MS/MS-Experimente). Die erhaltenen Peaks wurden in die Datenbank MASCOT eingespeist und mit bekannten Proteinfragmenten abgeglichen.

Zur Untersuchung der Proteine durch MALDI-TOF-MS wurde 1  $\mu\text{l}$  der Peptidlösung in einem Tropfen TFA (2 %) gelöst und auf die Matrix (0.5  $\mu\text{l}$  einer gesättigten Lösung von  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure in Aceton) getropft. Die Probe wurde getrocknet und anschließend mit TFA (10  $\mu\text{l}$ , 0.1 %) gewaschen. Die massenspektrometrische Untersuchung erfolgte an einem Bruker REFLEX Massenspektrometer (Bruker-Daltonik, Bremen, D). Die Kalibrierung erfolgte mit Autolyseprodukten des Trypsin. Auch diese Spektren wurden anschließend mit MASCOT untersucht.

## 2.8 Computerprogramme

Kontrolle, Analyse der HPLC: Chemstation for LC 3D, Agilent Tech., Palo Alto, USA

Kontrolle, Analyse der Radio-HPLC: Flo-One for Windows, Canberra-Packard, Dreieich, D

Auswertung enzymkinetischer Daten: EKI3, Physik.-Chem. Institut, Universität Tübingen

Auswertung von Sequenzen:

DNASTAR 5.0, DNASTAR Inc., Madison, USA

ExPASy Translate tool: <http://www.expasy.org/tools/dna.html>

ExPASy Compute pI/Mw: [http://www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)

SWISS-MODEL: <http://swissmodel.expasy.org/>

DeepView/Swiss-PdbViewer 3.7: GlaxoSmithKline GmbH + Co. KG, München, D

Multalin<sup>[108]</sup>: <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>

BLAST am National Institute of Health: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

MASCOT (Matrix Science, London, UK): <http://www.matrixscience.com>

Enzymdatenbank: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>

### 3. Ergebnisse

#### **3.1 Voraussetzungen für diese Arbeit**

##### 3.1.1 Grundlage dieser Arbeit

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung der Diarylheptanoidbiosynthese. Aus Gründen, die unter 1.4.2 bereits näher erläutert wurden, sollte diese Biosynthese aus zwei Kondensationsschritten bestehen. Dies sind (1) die Kondensation eines Phenylpropanoids (Starter) mit Malonyl-CoA (Verlängerer) und (2) die Kondensation dieses Intermediates mit einem weiteren Phenylpropanoid (Beender) zum Diarylheptanoid. Zumindest die 1. Kondensation sollte - so die Arbeitshypothese dieser Dissertation - durch eine Polyketidsynthase Typ III durchgeführt werden. Da bereits eine Reihe von Enzymen dieser Familie bekannt und diese untereinander sehr ähnlich waren, war es möglich, molekularbiologische Methoden bei der Untersuchung zu verwenden. Bei der Auswahl der Pflanze kam es darauf an, dass (1) Diarylheptanoide vorkommen, (2) die Pflanze jederzeit verfügbar ist und (3) sie sich gut für die verwendeten Methoden eignet. Wie unter 3.1.3 beschrieben, ist *Wachendorfia thyrsiflora* dafür sehr gut geeignet. Um die vielfältigen Untersuchungen durchführen zu können, war es weiterhin nötig, einige mögliche Substrate für die Enzymreaktionen und Referenzverbindungen zu synthetisieren.

##### 3.1.2 Synthese

###### *3.1.2.1 Coenzym A-Derivate*

Kondensierende Enzyme akzeptieren die Startersubstrate nur in ihrer aktivierten Form, z. B. als Coenzym A-Ester (CoA-Ester) oder Glykoside. Für PKS III sind bisher nur CoA-Ester als Substrate bekannt. Zur Untersuchung der Substratspezifität der zu untersuchenden Enzyme war es deshalb notwendig, CoA-aktivierte Phenylpropanoide einzusetzen. Einige kommerziell nicht erhältliche CoA-Ester wurden deshalb nach literaturbekannten Verfahren synthetisiert. Dabei handelte es sich um Cinnamoyl<sup>[109]</sup>, Dihydrocinnamoyl<sup>[110]</sup>, Caffeoyl<sup>[111]</sup>, Dihydrocaffeoyl<sup>[112]</sup>, Feruloyl<sup>[112]</sup>, Dihydroferuloyl<sup>[113]</sup>, *o*-Cumaroyl<sup>[113]</sup> und Phenylpyruvatoyl-CoA. Es wurde die Methode von Wang, Mayer und Zenk<sup>[98]</sup> benutzt. Unter Verwendung von Dizyklohexylcarbodiimid wurde zunächst die verwendete Säure zum N-Hydroxysuccinimid umgesetzt (Abb. 3.1 A). Aus diesem Produkt und HSCoA wurde in einem Lösungsmittelgemisch von Aceton (Succinimide löslich) und Wasser (HSCoA löslich) der CoA-Ester synthetisiert (Abb. 3.1 B). Zur Reinigung dieser wasserlöslichen Produkte wurde nichtumgesetztes Succinimid durch Entfernen des Acetons ausgefällt und abzentrifugiert. Der

wässrige Überstand wurde anschließend mit Ammoniumacetat (4% w/v) versetzt und auf eine mit 4 %-iger Ammoniumacetat-Lösung gewaschene RP18-Säule gegeben. Unter diesen Bedingungen eluierte freies HSCoA, während das Produkt auf der Säule verblieb und anschließend mit Wasser eluiert wurde. Die Ausbeuten dieser Reaktionen schwankten je nach eingesetztem Succinimidester stark zwischen 2 - 55 %. Die synthetischen Details wurden in Abschnitt 2.2.1 zusammengestellt. Die Synthesen von Dihydrocaffeoyl-, Dihydroferuloyl- und Phenylpyruvatoyl-CoA waren zuvor noch nicht veröffentlicht worden.

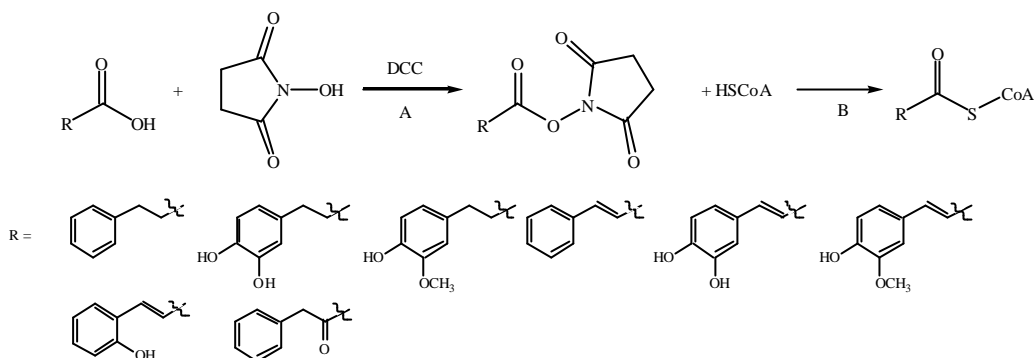


Abb. 3.1: Synthese von CoA-Estern.

A) Synthese von N-Hydroxysuccinimid-Derivaten: 24 h, RT, unter Argon.

B) Synthese von Thioestern: 12 h, 0°C, unter Argon.

Zu den weiteren Bedingungen siehe 2.2.1.

### 3.1.2.2 Diketid-N-Acetylcysteamin-Derivate

In der Literatur wurde beschrieben, dass Polyketidsynthasen statt CoA-Derivaten auch N-Acetylcysteamin-Derivate (NAC, Abb. 3.2) umsetzen<sup>[114,115]</sup>. N-Acetylcysteamin-Derivate (NAC) sind insbesondere dann als Substrate in Enzymassays interessant, wenn die entsprechenden CoA-Ester nicht zur Verfügung stehen. Das war bei einer möglichen zweistufigen Biosynthese für die dann zu erwartenden Intermediate der Fall, die zugleich Substrate für den zweiten Kondensationsschritt sind. Entsprechend der Arbeitshypothese kommen dafür die durch Kondensation eines Phenylpropanoid-Starters mit Malonyl-CoA entstehenden Diketid-CoA-Ester in Frage. Versuche zur Synthese der Diketide, speziell der Zimtsäure (3-Oxo-5-phenylpent-4-en-säure) und *p*-Cumarsäure (3-Oxo-5-(4-Hydroxyphenyl)-pent-4-en-säure) führten nicht zu stabilen Produkten (C. Paetz, unveröffentlicht), sodass die weitere Umsetzung zu CoA-Estern oder NAC-Estern nicht möglich war. In der Literatur wurden keine Synthesen von Diketid-CoA-Estern, jedoch Synthesen von Diketid-NAC-Derivaten beschrieben<sup>[99]</sup>. Dazu wurden die Phenylpropionylchloride mit Meldrumsäure (Abb. 3.3 A) und die dabei entstandenen Addukte weiter mit NAC zu den Diketid-NAC-Derivaten (Abb. 3.3 B) umgesetzt.

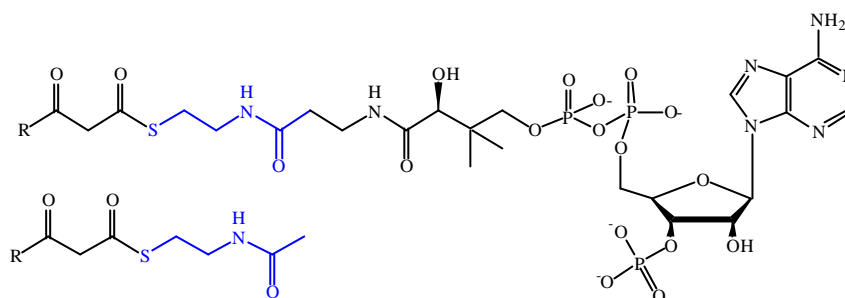


Abb. 3.2: Vergleich der Strukturen von Diketid-Coenzym A (oben) und Diketid-N-acetylcysteamin (unten), blau: NAC-Strukturteil. R = Phenylpropanoid- oder Alkylreste.

Insbesondere die Synthese der ungesättigten Verbindungen erwies sich als schwierig, da schon bei der Reaktion mit Meldrumsäure eine große Zahl von Zersetzungsprodukten nachweisbar waren. In diesem Fall wurde das Meldrumsäure-Produkt zunächst säulenchromatographisch (Kieselgel, Laufmittel: Chloroform/Methanol) gereinigt, bevor die Umsetzung mit N-Acetylcysteamin erfolgte. Die Ausbeuten dieser nichtoptimierten Synthesen lagen bei 15 - 20 % nach der Reinigung.

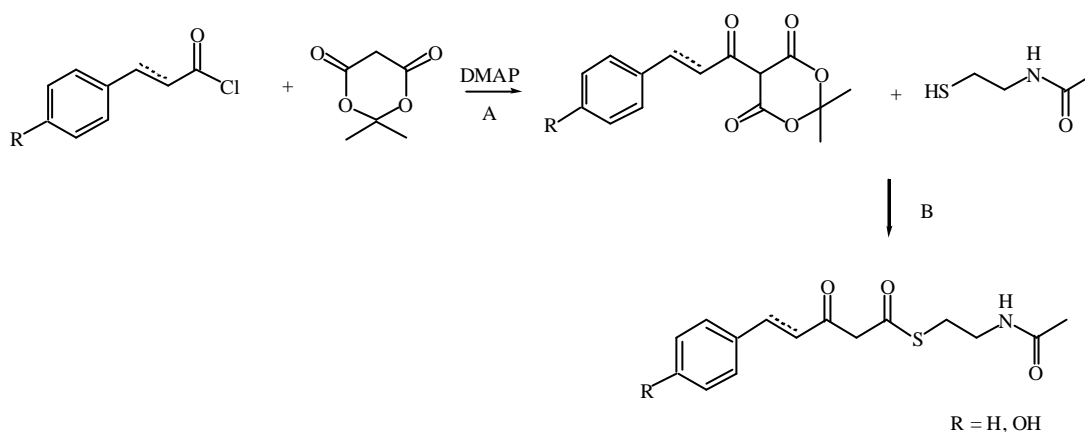


Abb. 3.3: Syntheschema von Diketid-NAC-Derivaten.

A) Synthese des Meldrumsäure Adduktes.

B) Synthese des NAC-Derivates.

Zu den Reaktionsbedingungen siehe 2.2.2. --- Einfach- oder Doppelbindung.

### 3.1.2.3 Diarylheptanoide

Nach den Betrachtungen zur Biosynthese der Phenylphenalenone (Abschnitt 1.3.2) erschien die Akkumulation von linearen Diarylheptanoiden in *Wachendorfia thyrsiflora* eher unwahrscheinlich. Ausnahmen könnten solche Strukturen sein, die wegen ihrer strukturellen Eigenschaften nicht zur Zyklisierung neigen sollten. Einige der infrage kommenden Diarylheptanoide wurden als Referenzsubstanzen zur Prüfung des Vorkommens in *Wachendorfia thyrsiflora* synthetisiert. Sie wurden außerdem als potentielle Produkte der zu bearbeitenden Enzyme der Diarylheptanoid-Biosynthese angesehen und waren deshalb als Referenzverbindungen für Enzymassays interessant. Es wurden die folgenden Diarylheptanoide als Vergleichsubstanzen synthetisiert: (4*E*)-1,7-Diphenylhept-4-en-3-on<sup>[116]</sup>,



(4*E*,6*E*)-1,7-Diphenylhepta-4,6-dien-3-on<sup>[117]</sup>, 5-Hydroxy-1,7-diphenylheptan-3-on<sup>[116]</sup>, 1,7-Diphenylheptan-3,5-dion<sup>[118]</sup> und (4*E*,6*E*)-1,7-Diphenylhepta-4,6-dien-3-ol<sup>[116]</sup>. Die Synthese von (4*E*)-1,7-Diphenylhept-4-en-3-on (Abb. 3.4 A) und (4*E*,6*E*)-1,7-Diphenylhepta-4,6-dien-3-on (Abb. 3.4 B) erfolgte durch Wittig-Horner-Reaktion unter Verwendung eines Verfahrens von Baranovsky et al.<sup>[100]</sup>. Durch Hydrierung mit NaBH<sub>4</sub> wurde aus (4*E*,6*E*)-1,7-Diphenylhepta-4,6-dien-3-on anschließend racemisches (4*E*,6*E*)-1,7-Diphenylhepta-4,6-dien-3-ol synthetisiert (Abb. 3.4 C). Die Synthese von 5-Hydroxy-1,7-diphenylheptan-3-on erfolgte in einer Aldolkondensation aus 4-Phenyl-2-butanon und Phenylpropionaldehyd (Abb. 3.4 D) ebenfalls nach einer Methode von Baranovsky et al.<sup>[100]</sup>. Daraus wurde 1,7-Diphenylheptan-3,5-dion durch Oxidation mit PDC synthetisiert (Abb. 3.4 E).

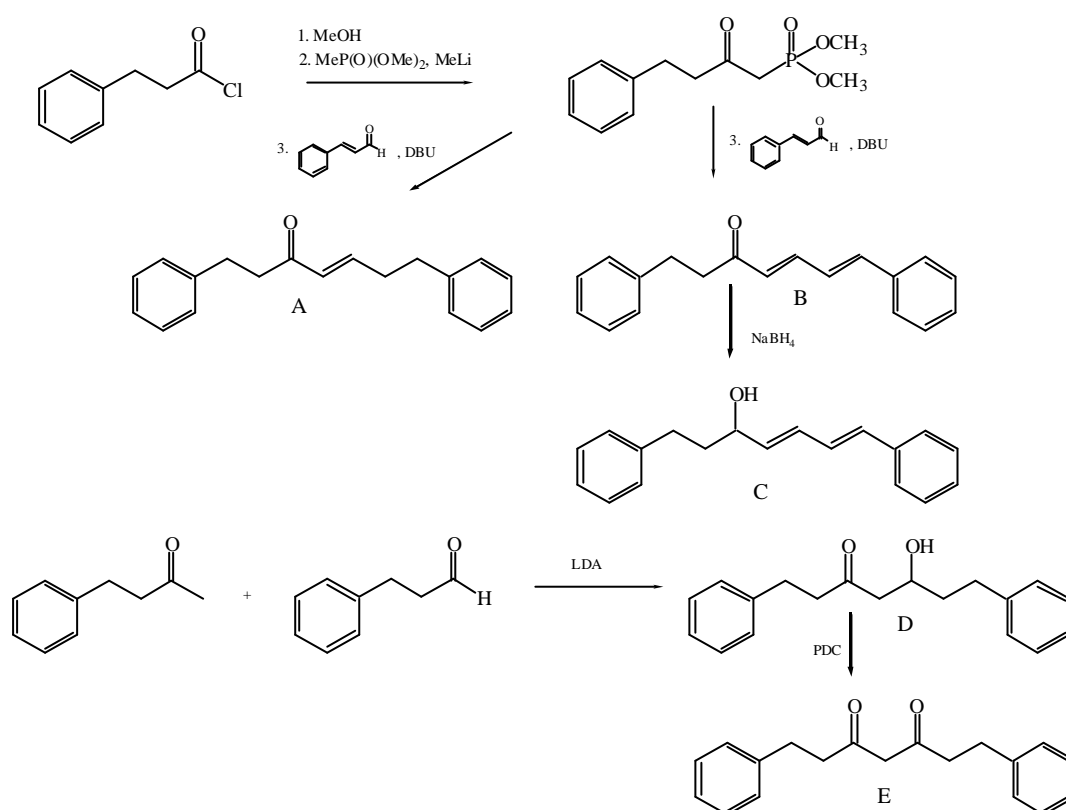


Abb. 3.4: Schema der Synthesen folgender Diarylheptanoide:

A: (4*E*)-1,7-Diphenylhept-4-en-3-on, B: (4*E*,6*E*)-1,7-Diphenylhepta-4,6-dien-3-on, C: (4*E*,6*E*)-1,7-Diphenylhepta-4,6-dien-3-ol, D: 5-Hydroxy-1,7-diphenylheptan-3-on und E: 1,7-Diphenylheptan-3,5-dion. Die Reaktionsbedingungen sind Abschnitt 2.2.3 zu entnehmen.

Außerdem standen für Vergleichszwecke zwei Diarylheptanoide mit Hydroxylgruppen in den Phenylringen zur Verfügung: (4*E*,6*E*)-1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl)-hepta-4,6-dien-3-on und (4*E*,6*E*)-1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-7-phenyl-hepta-4,6-dien-3-on<sup>[100]</sup>.

### 3.1.3 Auswahl der Pflanze

Bei der Auswahl einer geeigneten Pflanze zur Untersuchung der Biosynthese gab es folgende drei Punkte zu beachten: (1) das Vorkommen von Diarylheptanoiden, (2) Verfügbarkeit der Pflanze und (3) Eignung aus molekularbiologischer Sicht. In unserer Arbeitsgruppe wurden von einer Reihe von Pflanzen (z.B. der Gattungen *Haemodoraceae* und *Zingiberaceae*) Wurzelkulturen etabliert. Diese sind ganz besonders gut für solche Untersuchungen geeignet, weil sie zum einen stets verfügbar sind und zum anderen weil alle vorhandenen Sekundärstoffe auch in diesem Organ gebildet werden müssen. In allen Kulturen wurden Diarylheptanoide, zumeist in der zyklischen Form als Phenylphenalenone, nachgewiesen.

Um Aufschlüsse darüber zu erhalten, welche Kulturen oder Pflanzen sich aus molekularbiologischer Sicht besonders gut für die Untersuchung der Biosynthese von Phenylphenalenonen eignen, wurde versucht, von verschiedenen Pflanzen (*Wachendorfia thyrsiflora*, *Anigozanthos preissii*, *Musa*, *Zingiber cerumbet*, *Zingiber officinalis*, *Musella lasiocarpa* und *Xiphidium caeruleum*) RNA zu extrahieren. Von *Musella lasiocarpa* konnte keine RNA isoliert werden. Die mRNAs der anderen Pflanzen wurden in die cDNAs umgeschrieben. Die cDNAs von *Musa* und *Zingiber cerumbet* ließen sich nicht erfolgreich als Template zur Amplifizierung eines 600 bp-großen Fragmentes mit Primern für Typ III-PKS einsetzen. Von *Wachendorfia thyrsiflora*, *Anigozanthos preissii*, *Zingiber officinalis* und *Xiphidium caeruleum* wurden dagegen 600 bp-große Fragmente mit PCR amplifiziert und auch sequenziert. Von diesen vier wurden zunächst *Wachendorfia thyrsiflora* und *Anigozanthos preissii* näher untersucht. Bei *Anigozanthos preissii* wurde jedoch eine Vielzahl von Sequenzen gefunden, die sich untereinander sehr ähnlich waren. Bei *Wachendorfia thyrsiflora* wurde dagegen zunächst nur eine Sequenz ermittelt. Daher wurde beschlossen, die Typ III-Polyketidsynthasen dieser Pflanze zu untersuchen. Ein weiterer Vorteil von *Wachendorfia thyrsiflora* war, dass im Gegensatz zu *Anigozanthos preissii* in dieser Pflanze bisher keine Stilbene und Flavonoide gefunden wurden. Damit war zu erwarten, dass die isolierten Proteine vermutlich keine CHS oder STS waren.

Die meisten bisherigen Biosyntheseuntersuchungen in unserer Gruppe wurden zwar an *Anigozanthos* durchgeführt. Der Einbau von Phenylpropanoiden und Malonat war jedoch auch bei *Musa* <sup>[19]</sup>, *Xiphidium* <sup>[11]</sup> und *Eichhornia* <sup>[17]</sup> nachgewiesen worden. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die Biosynthese der Phenylphenalenone in *Wachendorfia thyrsiflora* ähnlich abläuft. Fütterungsexperimente zeigten auch bei dieser Pflanze den Einbau von Phenylalanin, Dihydrozimtsäure und *p*-Cumarsäure in die Phenylphenalenone (C. Paetz, unveröffentlicht).

### 3.2 Die Untersuchung des Enzyms Wdf1

#### 3.2.1 Das Gen *wdf1* in nichtinduzierter Kultur

Nach der Entscheidung, die PKS III mittels molekularbiologischer Methoden zu untersuchen, und der Auswahl von *Wachendorfia thyrsiflora* als pflanzliches Objekt, war es zunächst notwendig, die RNA von *Wachendorfia thyrsiflora* zu isolieren.

Als Pflanzenmaterial wurden die hell-orangefarbenen, ca. 2-5 mm langen Wurzelspitzen einer sterilen Wurzelkultur ca. zwei Wochen nach der letzten Subkultivierung verwendet (Abb. 3.5).

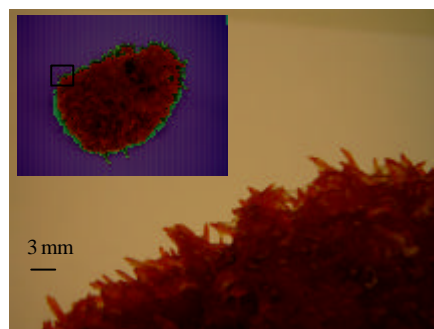


Abb. 3.5: Ausschnitt aus einer Wurzelkultur (das Rechteck oben links markiert den Ausschnitt) zur Darstellung der Wurzelspitzen, welche zur RNA-Extraktion verwendet wurden.

Aus diesem Zellmaterial (2.18 g) wurde 0.7 mg RNA ( $4.7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) mit Hilfe der Trizol-Methode (2.5.1) gewonnen. Zur Bestimmung der Reinheit dieser Präparation wurde eine RNA-Gelelektrophorese durchgeführt (Abb. 3.6 A). Beide (18S und 28S) rRNA-Banden waren deutlich sichtbar, eine Degradation der RNA nicht nachweisbar. Der Quotient der UV-Absorptionen bei 260 und 280 nm der RNA, welcher als grobes Kriterium der Verunreinigung mit Proteinen gilt, lag bei 1.8 (Abb. 3.6 B). Der Literaturwert für reine RNA liegt zwischen 1.9 und 2.1 <sup>[120]</sup>, sodass zumindest von einer partiellen Verunreinigung mit Protein ausgegangen werden musste. Dieser Anteil störte jedoch die folgenden Experimente nicht.

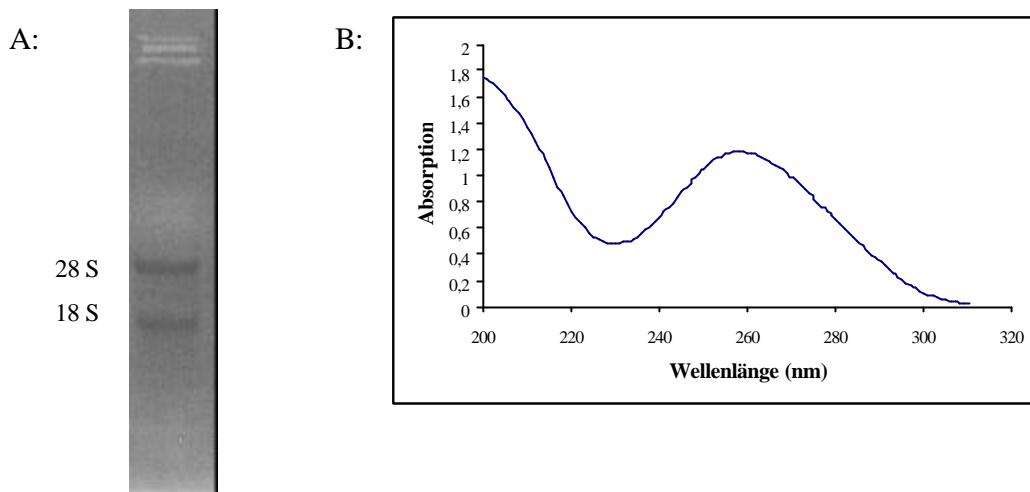


Abb. 3.6: Analyse der aus *Wachendorfia thyrsiflora* extrahierten RNA. A) Foto eines Elektrophoresegeles. Die Banden der 18 S- und der 28 S-rRNA wurden markiert. B) UV-Absorptionsspektrum dieser RNA-Präparation (1:50 Verdünnung einer RNA-Lösung mit  $4,7 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ).

Von dieser RNA-Präparation wurde durch Nutzung von Reverser Transkriptase cDNA gewonnen und anschließend PCR's mit den Primern K180\_oli und FGFG\_oli (siehe 2.5.3) durchgeführt. Diese Primer waren so konstruiert worden, dass sie komplementär zu hoch konservierten Bereichen der Typ III-Polyketidsynthasegene sind. Da bei Enzymen derselben Proteinsequenz unterschiedliche cDNA-Sequenzen möglich sind, wurden Mischungen von Primern (sogenannte degenerierte Primer) benutzt. Dabei wurde ein 600 bp großes Fragment erhalten (Abb. 3.7). Dieses wurde mit Hilfe der bei Verwendung von Taq-Polymerase entstehenden Adenin-Überhänge in den Vektor pCR<sup>®</sup> II-TOPO<sup>®</sup> kloniert (siehe 2.5.6.4). Zwanzig der erhaltenen Klone wurden sequenziert. Es gab lediglich vereinzelte Abweichungen in den Sequenzen, sodass eine eindeutige Zuordnung zu einer Proteinsequenz dieses Fragmentes möglich war. Um das vollständige Gen zu erhalten, wurden von diesem Resultat ausgehend Primer für die 5'- und 3'-RACE synthetisiert (siehe 2.5.4) und anschließend die gesamte Sequenz der mRNA (Anhang, Abb. A3.1) des Gens *wdf1* erhalten.

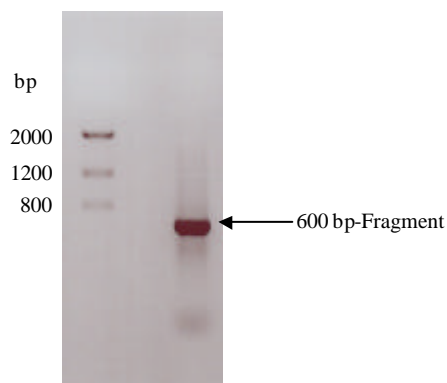


Abb. 3.7: Elektrophoresegel, linke Bahn: Low DNA Mass Ladder, rechte Bahn: 5  $\mu\text{l}$  des PCR-Ansatzes zur Gewinnung eines 600 bp großen Fragmentes einer Typ III-Polyketidsynthase aus der cDNA von *Wachendorfia thyrsiflora*.

### 3.2.2 Die Expression des Proteins Wdf1

Aus der mRNA-Sequenz für das Gen *wdf1* (3.2.1) wurde die in Abb. 3.8 dargestellte Proteinsequenz abgeleitet. Dieses Protein hat 394 Aminosäuren und eine relative Molekülmasse von 43080 Da. Die Molekülmasse liegt im Bereich der Größe von anderen PKS Typ III. Circa 61 % der Aminosäuren dieses Proteins sind identisch mit denen in Chalconsynthasen, der Homologiegrad beträgt ca. 80 %. Damit gehört dieses Protein zu den Typ III-Polyketidsynthasen, ist jedoch von der Aminosäuresequenz her keine typische Chalconsynthase, da sich diese Enzyme untereinander noch wesentlich ähnlicher sind.

```
MASTEGIQAYRNNMAEGPATIMAIGTANPPNVVDASTFPDYYWRVTNSEHLSPEYRVKLRICERSSIRKRLVL
TEQLLENPTLTITYVDASDERQSIVLDAVPKLACEAAAKAIKEWGRPKTDITHMVVCTGAGVDVPGVDYKMMNL
LGLPPTVNRVMLYNVGCHASGTVLRIAKDLAENNKGARVLVVSSEVSMFFRGPAGDVEILLGQALFGDGSAAI
IVGADPIEGVEKPIFQIFSASQMTLPEGEHLVAGHLRELGLTFHLKPQLPNTVSSNIHKPLKKAPEPLNITDWSN
IFWIHVPGGRAILDQVQEKIGLEENKLDVSRVLAENGNMMSASVFFIMDEMRRKRSAAQGCSTTGEGHEWGVLF
FGPGLSIETVVLHVSPLSI
```

Abb. 3.8: Proteinsequenz des Proteins Wdf1, hergeleitet aus der mRNA-Sequenz für das Gen *wdf1* aus Abschnitt 3.2.1 (Abb. A 3.1).

Um die Expression des Proteins zu ermöglichen, wurden Primer konstruiert, die das Gen amplifizieren sollten und zusätzliche Restriktionsschnittstellen trugen (*dhs20\_wdf\_chs1\_Bam* und *dhs21\_wdf\_chs1\_Hind*). Damit war es möglich, das amplifizierte Gen in den Vektor pHis8 zu klonieren. Auf die erste Aminosäure (Methionin) wurde dabei verzichtet, da dies u.U. zu Problemen bei der Expression führen könnte. Die Expression erfolgte mit einer zusätzlichen N-terminalen Sequenz, die im Vektor kodiert war (MKHHHHHHHHGGLVPRGSHGGS). Diese Sequenz enthält den His-Tag und eine Schnittstelle für Thrombin, sodass der His-Tag abspaltbar ist. Das Anschalten der Proteinexpression wird durch den T7-Promotor gesteuert, wodurch die Induktion mit IPTG möglich ist. Zur Kontrolle der Expression wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem ein Teil der Zellen nach Erreichen einer OD von 0.6 mit IPTG induziert wurde. Der andere Teil wurde nicht induziert und diente als Negativkontrolle. Nach 4 h wurden 0.5 OD<sub>600</sub> der Zellen abzentrifugiert, das Pellet mit Probenpuffer vermischt und bei 95°C denaturiert. Dieses Gemisch wurde auf das in Abb. 3.9 A gezeigte Gel geladen. Von diesem Gel wurde ein Westernblot mit Antikörpern gegen Chalcon- und Stilbensynthasen durchgeführt (Abb. 3.9 B). Damit konnte gezeigt werden, dass das exprimierte Protein tatsächlich strukturelle Ähnlichkeit mit Chalconsynthasen aufwies.

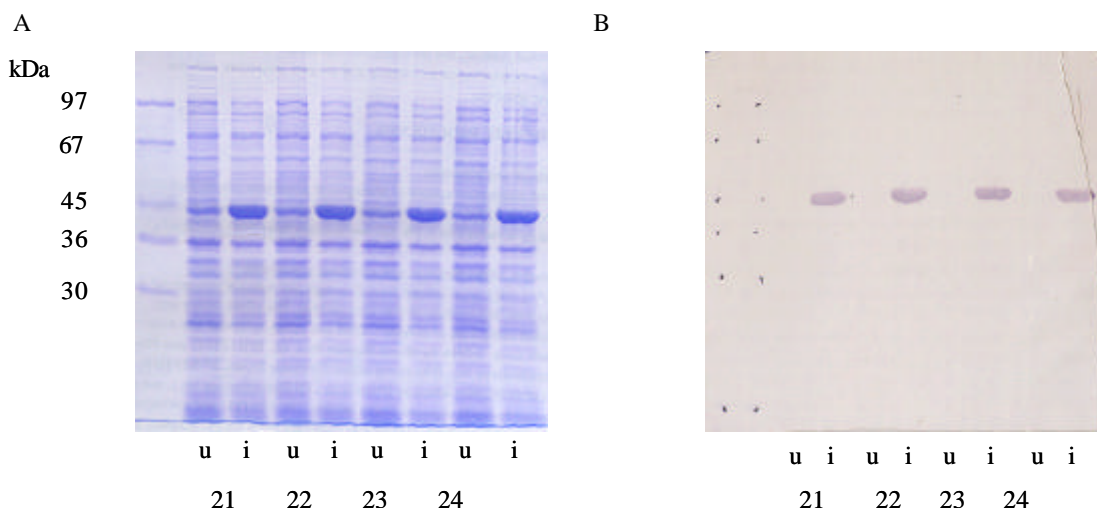


Abb. 3.9: Nachweis der Expression des Proteins Wdf1. A: Mit Coomassie gefärbtes Proteingel, B: Westernblot mit einer Antikörpermischung gegen Chalcon- und Stilbensynthase aus *Pinus sylvestris*. 21-24: Proteinextrakte verschiedener Klone, die alle das Konstrukt aus pHis8 mit dem Gen *wdf1* trugen. u: Extrakte nichtinduzierter Zellen, i: Extrakte induzierter Zellen.

Zur Expression im großen Maßstab wurden 750 ml *E. coli*-Kultur verwendet (2.6.1). Bei Erreichen einer Zelldichte von 0.6 - 0.8 wurde mit 0.5 mM IPTG induziert. Nach der Induktion (4 h) wurde eine Zelldichte von  $OD_{600}$  3.0 - 3.5 erreicht.

Zur Reinigung des Proteins Wdf1 wurde der nach dem Aufschluß mit der French-Press erhaltene Rohextrakt (2.6.2) auf eine mit Nickel beladene Affinitätschromatographiesäule (HiTrap<sup>®</sup> Chelating Column) geladen. Die Elution erfolgte mit Imidazol in den Konzentrationen 80, 150 und 500 mM in Phosphatpuffer (20 mM Phosphat, pH 7.4, 0.5 M NaCl). Abb. 3.10 zeigt den Verlauf der Reinigung. Das durch Elution mit 500 mM Imidazolösung erhaltene Protein wurde in drei Fraktionen stark angereichert, die Reinheit betrug circa 90 %. Ein Teil der Proteinbanden mit kleinerem Molekulargewicht als 40 kDa ließ sich auf das Vorhandensein von unvollständig synthetisiertem Protein zurückführen. Die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt (Abb. 3.10: 2 - 4 bei 500 mM Imidazol) wurden vereinigt. Anschließend wurde eine Gelfiltration an Sephadex G-25 durchgeführt. Damit wurde das Imidazol entfernt und die Konzentration von Natriumchlorid auf 0.1 M reduziert. Zur Elution wurde der als Reaktionspuffer besser geeignete HEPES-Puffer (0.1 M HEPES, pH 7.0, 0.1 M NaCl, 2 mM DTT) verwendet. Nach der Gelfiltration wurde eine Proteinkonzentration von  $3.2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  Protein Wdf1 in einem Gesamtvolumen von 1.5 ml (Gesamtproteinausbeute: 4.8 mg) erhalten.

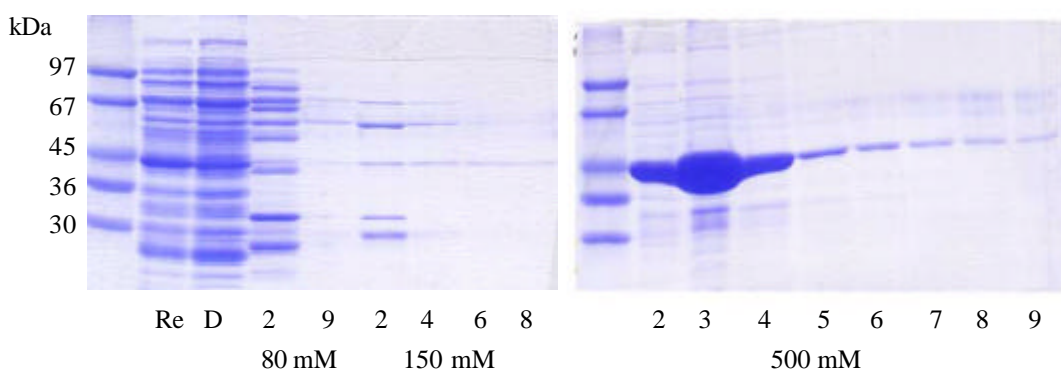


Abb. 3.10: Elektrophoresegel zur Darstellung der Reinigung des Enzyms Wdf1 mittels Affinitätschromatographie, Re: Rohextrakt, D: Durchlauf (nicht gebundenes Protein), Fraktionen 2 und 9 der Elution mit 80 mM Imidazol, Fraktionen 2, 4, 6, 8 der Elution mit 150 mM Imidazol, Fraktionen 2 - 9 der Elution mit 500 mM Imidazol.

Zum Nachweis der korrekten Translation des 45369 Da großen Proteins Wdf1 (Größe mit His-Tag) wurde dieses massenspektrometrisch untersucht. Dafür wurde die Proteinbande aus dem Gel ausgeschnitten, das Protein enzymatisch mit Trypsin und GluC gespalten und die Fragmente mit MALDI-TOF und ESI-MS untersucht. Dabei wurden die in Anhang 3 (Tabellen A4.1 und A4.2) notierten Massen erhalten, die sich den jeweiligen Fragmenten des Proteins zuordnen ließen. Aufgrund der Aufarbeitungsprozedur waren einige Methioninreste oxidiert und das entsprechende Fragment etwas größer als theoretisch berechnet. Durch die erhaltenen Fragmente wurden insgesamt 50 % der Gesamtlänge des Proteins abgedeckt. Damit wurde nachgewiesen, dass die translatierte Aminosäuresequenz identisch mit der aus der mRNA abgeleiteten Aminosäuresequenz ist.

### 3.2.3 Enzymatische Aktivität des Proteins Wdf1

#### *3.2.3.1 Abhängigkeit der Enzymaktivität von Wdf1 von der Temperatur und dem pH-Wert*

Nach gelungener Expression des Proteins Wdf1 wurde dieses auf seine Aktivität im Enzymassay (2.6.6) untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Protein die höchsten Aktivitäten mit aliphatischen Starter-CoAs (Hexanoyl-CoA und Octanoyl-CoA) aufwies, die jedoch vermutlich nicht die natürlichen Substrate des Enzyms sind. Daher wurden die folgenden Untersuchungen mit Dihydrocinnamoyl-CoA als Starter-CoA-Ester durchgeführt, welches das Phenylpropanoyl-CoA ist, mit dem das Enzym die höchste Aktivität zeigt. Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde das Enzym Wdf1 mit den Substraten bei 37°C 30 Minuten in Tris-, HEPES-, Phosphat- und Bis-Tris-Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten inkubiert (Abb. 3.11). Von allen Versuchen wurden Zweifach-Bestimmungen durchgeführt. Die Enzymaktivität wurde bestimmt als Fläche des Produktpeaks im Radio-HPLC-Chromatogramm und umgerechnet in den Umsatz von Malonyl-CoA ( $\text{nM} \cdot \text{min}^{-1}$ ).

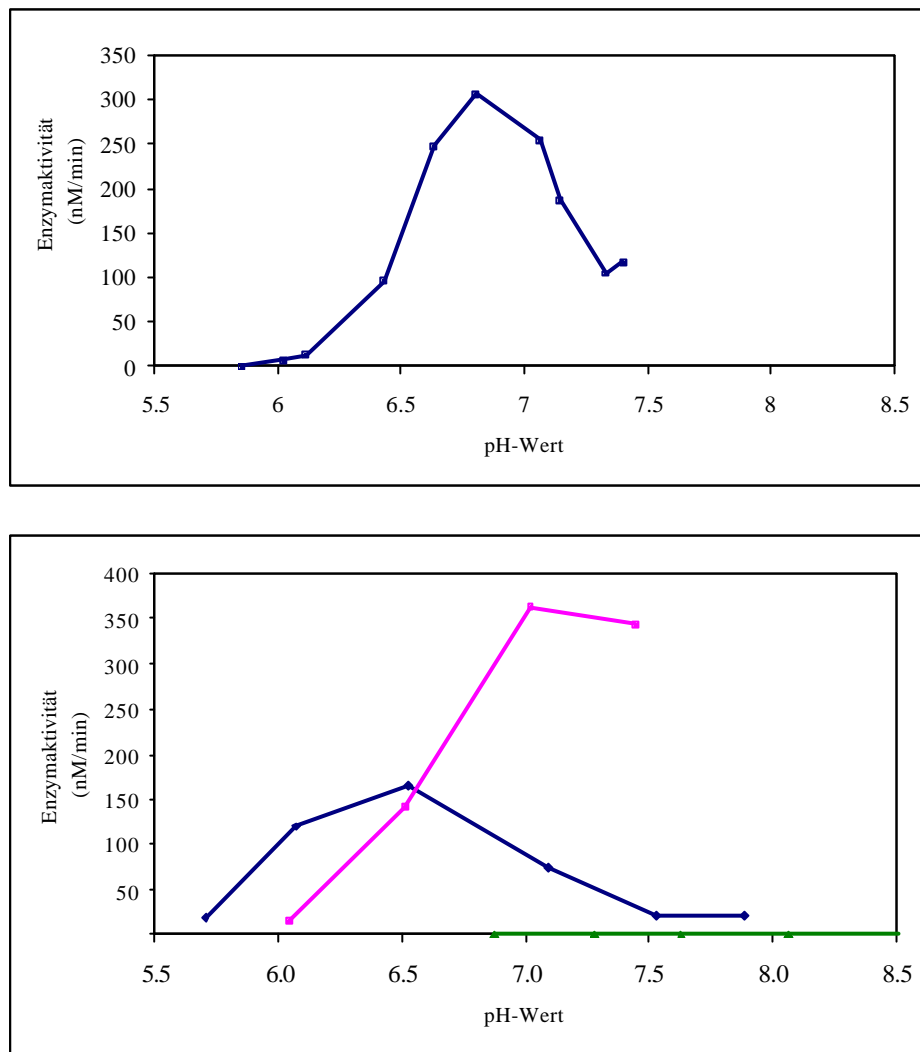


Abb. 3.11: Abhängigkeit der Enzymaktivität des Enzyms Wdf1 vom pH-Wert. A: in HEPES-Puffer, B: in Phosphatpuffer (blau), in Bis-Tris/HCl-Puffer (rosa), in Tris-Puffer (grün). Die Enzymaktivität wurde als Umsatz von  $\text{nM Malonyl-CoA} \cdot \text{min}^{-1}$  angegeben. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte abgebildet. Pufferkonzentration jeweils 0.1 M. Assay:  $200 \mu\text{M}$  Dihydrocinnamoyl-CoA,  $80 \mu\text{M}$  Malonyl-CoA,  $3 \mu\text{l}$  Proteinlösung,  $37^\circ\text{C}$ , 30 min.

Das pH-Optimum dieses Proteins war bei Verwendung verschiedener Puffer unterschiedlich und lag bei pH 6.8 - 6.9 in HEPES-Puffer, pH 6.5 in Phosphat-Puffer und pH 7 in Bis-Tris/HCl-Puffer. In Tris-Puffer war das Enzym nicht aktiv. Die Aktivität des Enzyms war in Bis-Tris/HCl und HEPES-Puffer zweifach höher als in Phosphatpuffer. Zur Bestimmung weiterer Enzymkonstanten wurde daher 0.1 M HEPES-Puffer, pH 6.85 verwendet. Das Optimum des Enzyms in Bis-Tris/HCl lag zu sehr am Rand der Pufferkapazität.

Für die Bestimmung der Temperaturabhängigkeit wurde das Protein mit den Substraten in 0.1 M HEPES-Puffer, pH 6.85 30 min inkubiert. Es wurden ebenfalls Zweifach-Bestimmungen durchgeführt. Das Temperaturoptimum dieses Enzyms lag bei  $37^\circ\text{C}$  (Abb. 3.12). Diese Temperatur wurde für alle weiteren Bestimmungen verwendet.



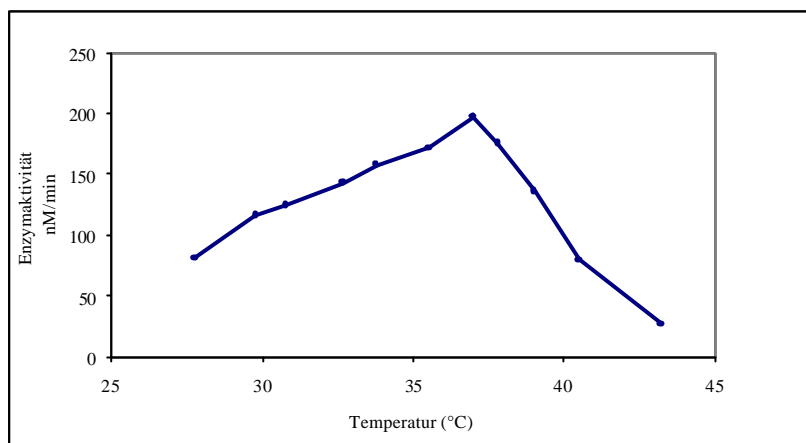


Abb. 3.12: Abhängigkeit der Enzymaktivität des Enzyms Wdf1 von der Inkubationstemperatur. Die Enzymaktivität wurde als Umsatz von nM Malonyl-CoA·min<sup>-1</sup> angegeben. Es wurden Doppelbestimmungen in HEPES-Puffer (0.1 M, pH 6.85) durchgeführt. Bedingungen des Enzymassays wie Abb. 3.11.

### 3.2.3.2 Substratspezifität des Enzyms Wdf1

Das Enzym Wdf1 wurde mit einer Reihe von Starter-CoA-Estern als Substrate getestet. In Abb. 3.13 wurden die Aktivitäten des Enzyms mit diesen Startern mit der Aktivität mit Dihydrocinnamoyl-CoA verglichen. Neben Dihydrocinnamoyl-CoA wurden auch Dihydro-*p*-cumaroyl-CoA (58 % der Aktivität des Enzyms mit Dihydrocinnamoyl-CoA) sowie die ungesättigten Cinnamoyl- und *p*-Cumaroyl-CoAs (10 bzw. 40 %) umgesetzt. Deutlich wurde hier, dass die Dihydroverbindungen wesentlich besser als die ungesättigten Analogen umgesetzt wurden. Daneben war das Enzym auch mit Dihydroferuboyl- und Dihydrocaffeoyl-CoA (8 und 5 %) etwas aktiv, die Modifikationen in *m*-Stellung aufwiesen. Allerdings war das Enzym mit Caffeoyl- und Feruboyl-CoA nicht aktiv. Eine funktionelle Modifikation an *o*-Position des Phenylrings war jedoch nicht möglich, wie die Inaktivität des Enzyms mit *o*-Cumaroyl-CoA zeigte. Die Aktivität von Wdf1 mit Substraten, die eine Verkürzung der Phenylpropanoylkette aufwiesen, war deutlich reduziert. Das Enzym war mit Phenylacetyl-CoA (75%) deutlich weniger aktiv als mit *p*-Dihydrocinnamoyl-CoA und inaktiv mit Benzoyl-CoA und hydroxylierten Benzoyl-CoAs. Besonders interessant war die Aktivität des Enzyms Wdf1 mit Phenylpyruvatoyl-CoA (40 % im Vergleich zu Dihydrocinnamoyl-CoA). Eine solche Umsetzung wurde bisher von keiner Typ III-Polyketidsynthase beschrieben. Das ist hier von besonderer Bedeutung, da die in *Wachendorfia thyrsiflora* vorkommenden Phenylphenalenone oftmals am C-5 des Phenalenonrings eine Sauerstofffunktion tragen (siehe Abb. 1.2). An dieser Stelle würde sich der  $\alpha$ -Carbonyl-Sauerstoff des Phenylpyruvates befinden, wenn das Substrat in den Phenalenon-Teil des Phenylphenalenons eingebaut wird. Im Abschnitt 4.2.2 wird der Sachverhalt ausführlich diskutiert.

Das Enzym war außerdem mit aliphatischen CoA-Estern aktiv, wie es bereits früher von Chalconsynthasen beschrieben wurde<sup>[82]</sup>. Besonders aktiv war das Enzym mit Octanoyl- (130 %) und *n*-Hexanoyl-CoA (110 %), während kürzere aliphatische Reste deutlich schlechter akzeptiert wurden (Valeroyl-CoA 70 %, Butyryl-CoA 15 %).

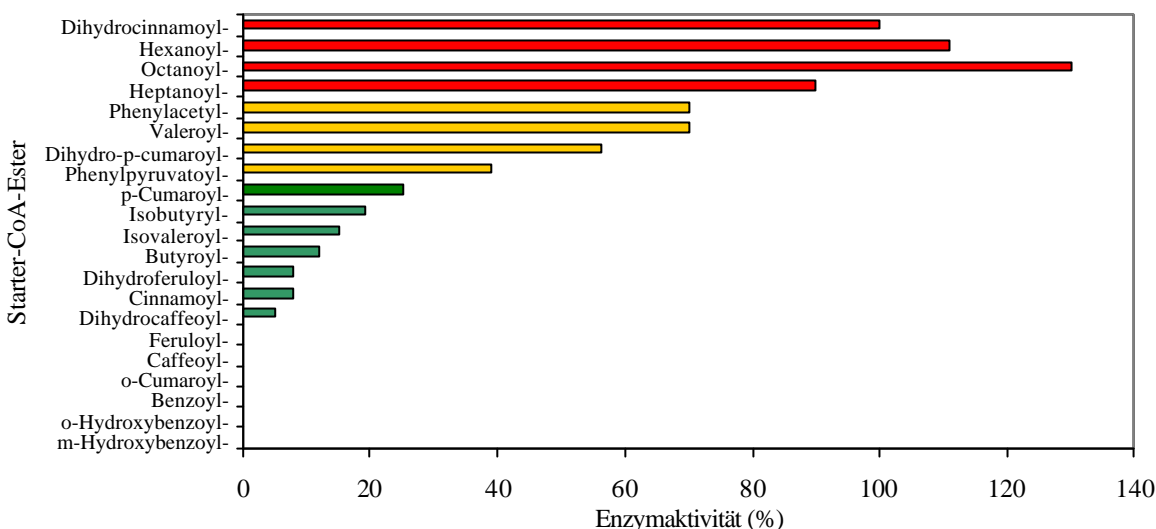


Abb. 3.13: Aktivität des Enzyms Wdf1 mit verschiedenen Starter-CoA-Estern, ausgedrückt in % relativ zur Aktivität von Wdf1 mit Dihydrocinnamoyl-CoA. Rot: das Enzym ist sehr aktiv, gelb: das Enzym hat mittlere Aktivität, grün: das Enzym hat geringe Aktivität, kein Balken: das Enzym ist mit diesem Substrat nicht aktiv. Enzymansätze: 200  $\mu$ M Starter-CoA, 80  $\mu$ M Malonyl-CoA, 3  $\mu$ l Protein lösung, 1 h, 37°C, 0.1 M HEPES, pH 6.85.

Das Enzym Wdf1 setzte Acetyl-CoA anstelle von Malonyl-CoA als Kettenverlängerer nicht um. Wurde Acetyl-CoA als Starter zusammen mit Malonyl-CoA als Kettenverlängerer eingesetzt, wurden ebenfalls keine Produkte erhalten. Allerdings akzeptierte das Enzym Wdf1 Methylmalonyl-CoA statt Malonyl-CoA als Kettenverlängerer.

Um zu testen, ob das Enzym in der Lage ist, den zweiten Kondensationsschritt (die Umsetzung eines Intermediates mit einem zweiten Phenylpropanoyl-CoA) durchzuführen, wurden Diketid-NAC-Derivate von Zimtsäure, *p*-Cumarsäure, Dihydrozimtsäure und Dihydro-*p*-cumarsäure zusammen mit den CoA-Estern von Dihydrozimtsäure, Dihydro-*p*-cumarsäure, Zimtsäure und *p*-Cumarsäure im Enzymassay eingesetzt. Diketid-NAC-Derivate können, wie in 3.1.2.2 beschrieben, in Enzymassays anstelle der Diketid-CoA-Ester eingesetzt werden<sup>[114,115]</sup>. Tatsächlich konnte in den durchgeführten Enzymassays keine Kondensation der Diketid-NAC-Derivate mit Phenylpropanoyl-CoAs nachgewiesen werden. Wurden die Diketid-NAC-Derivate jedoch als Starter zusammen mit Malonyl-CoA als Kettenverlängerer eingesetzt, wurden sie vom Enzym umgesetzt.

### 3.2.3.3 Bestimmung der Enzymprodukte

Nachdem die optimalen Bedingungen für die Enzymreaktion von Wdf1 gefunden waren, wurde versucht, die Strukturen der gebildeten Enzymprodukte näher zu charakterisieren. Wurde das Enzym mit *p*-Cumaroyl-CoA und [2-<sup>14</sup>C]Malonyl-CoA inkubiert, so erhielt man z.B. das in Abb. 3.14 gezeigte HPLC-Chromatogramm. Es wurden mehrere Substanzen bei unterschiedlichen Retentionszeiten mit UV-Absorptionen bei 280 nm nachgewiesen (Abb. 3.14 B). Aber nur zwei von diesen Substanzen zeigten auch ein Signal im Radiochromatogramm, waren also radioaktiv markiert (Abb. 3.14 A). Zur Bestimmung der chemischen Strukturen dieser markierten Verbindungen wurden 15 Enzymsätze gepoolt und in fünf Chromatographie-Läufen die interessanten Peaks getrennt voneinander aufgefangen. Die aufgefangenen Produkte wurden mit Hilfe von NMR und LC-MS analysiert. Das bei 24 min (34 % Acetonitril) eluierende Produkt wurde als *p*-Hydroxybenzalacetone [4-(4-Hydroxyphenyl)but-3-en-2-on] identifiziert. Abb. 3.15 zeigt das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der enzymatisch gebildeten, isolierten Substanz (3.15 A) zusammen mit dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum eines synthetischen Standards (3.15 B). Bei der Analyse durch HPLC-ESI-MS wurden für *p*-Hydroxybenzalacetone die folgenden Massen gefunden:  $m/z$  163 [M+H]<sup>+</sup>, 127, 115, 91, 43.

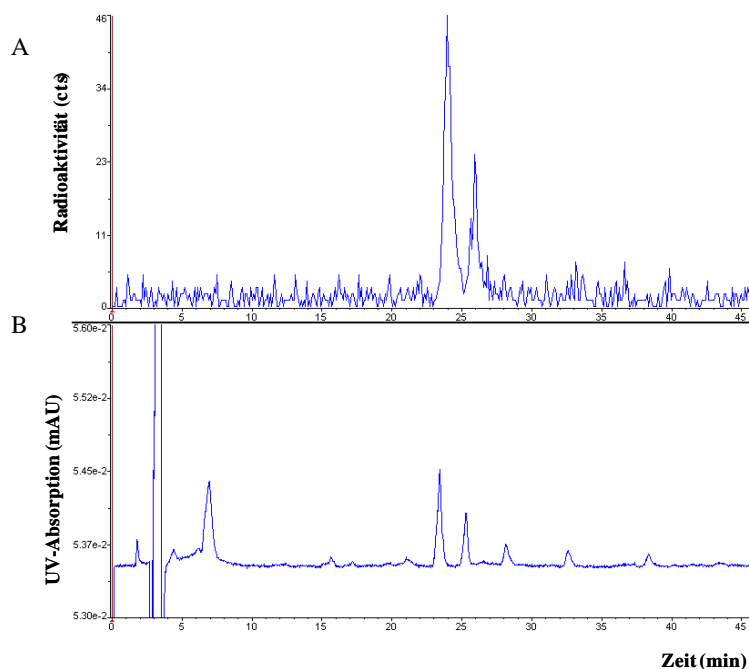


Abb.3.14: HPLC-Chromatogramm eines Enzymsatzes von Wdf1. A: Radiochromatogramm, B: UV-Spur des HPLC-Chromatogramms. Es wurden 3 µl der Enzymlösung mit 40 µM *p*-Cumaroyl-CoA und 99 µM Malonyl-CoA bei 37°C 40 min in 0.1 M HEPES, pH 6.85 inkubiert. HPLC-Methode: 2.3.1.1, Gradient A.

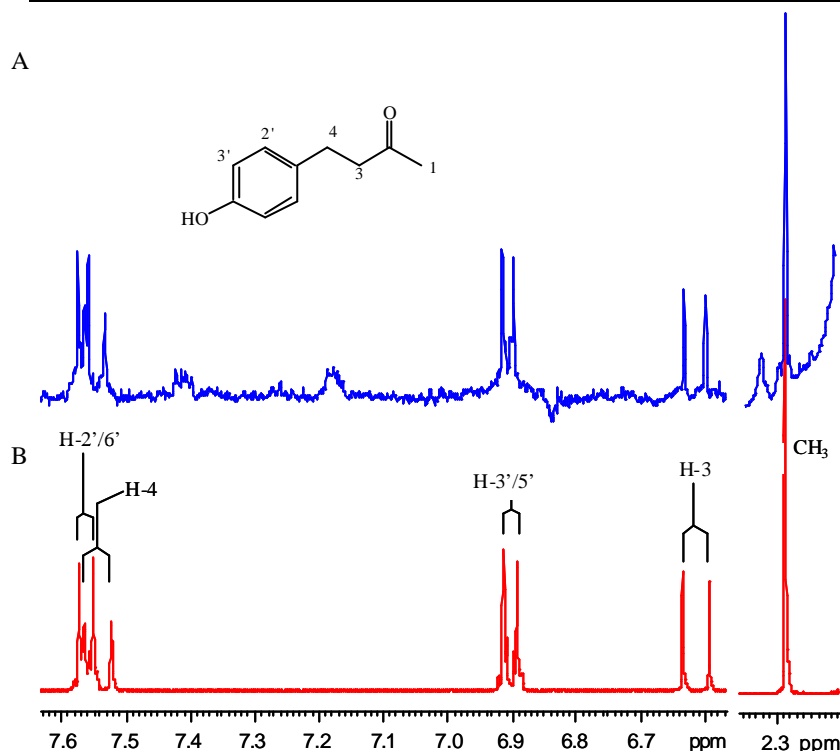


Abb 3.15:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren des *p*-Hydroxybenzalacetons, A: von Wdf1 enzymatisch gebildete und isolierte Substanz ( $R_t = 24$  min), B: synthetischer Standard, Einschub in A: Strukturformel des Produktes.

Für das zweite Produkt in Abb. 3.14 (NMR Spektrum in Abb. 3.16) mit einer Retentionszeit von 26 min (36 % Acetonitril) war kein Standard vorhanden. Die Struktur dieser Verbindung wurde durch  $^1\text{H}$ -NMR,  $1\text{rCOSY}$ -NMR und HPLC-MS als *p*-Hydroxystyrylpyron (6-(4-Hydroxystyryl)-4-hydroxy-2*H*-pyran-2-on) identifiziert. Bei der HPLC-ESI-MS wurden folgende Fragmente gefunden:  $m/z$  231  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 271  $[\text{M}+\text{MeCN}]^+$ , 205, 190.

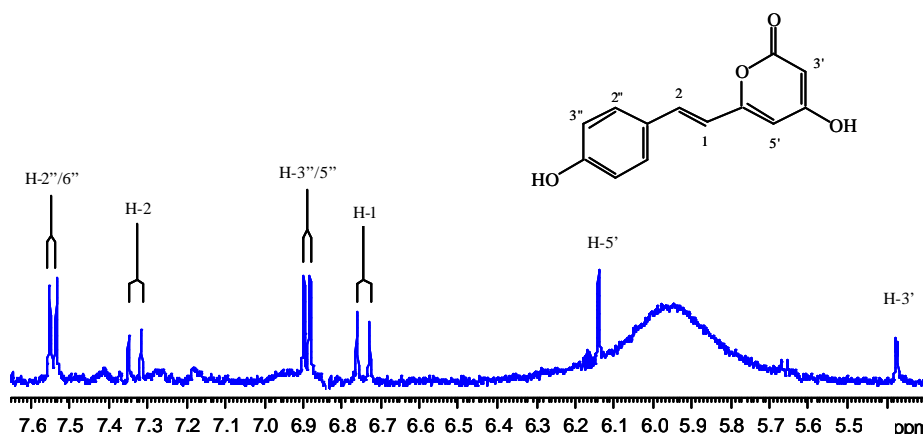


Abb 3.16:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Enzymproduktes *p*-Hydroxystyrylpyron von Wdf1. Durch HPLC isolierte Substanz ( $R_t = 26$  min).

Wurde statt *p*-Cumaroyl-CoA das gesättigte Dihydro-*p*-cumaroyl-CoA eingesetzt, wurde kein dem Hydroxybenzalacetone entsprechendes Produkt gefunden. Es wurde jedoch ein Produkt mit der Retentionszeit von 22 min (Elution mit 32 % Acetonitril) gefunden. Dabei handelte es sich um ein Pyron [6-(4-Hydroxyphenethyl)-4-hydroxy-2*H*-pyran-2-on]. Abb. 3.17 zeigt

HPLC-Chromatogramm (3.17 A: Radioaktivitätsspur, 3.17 B: UV<sub>280</sub>-Spur) und <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (3.17 C) dieser Struktur. Für diese Verbindung wurden in der HPLC-ESI-MS folgende Fragmente gefunden:  $m/z$  233  $[M+H]^+$ , 177, 126, 107.

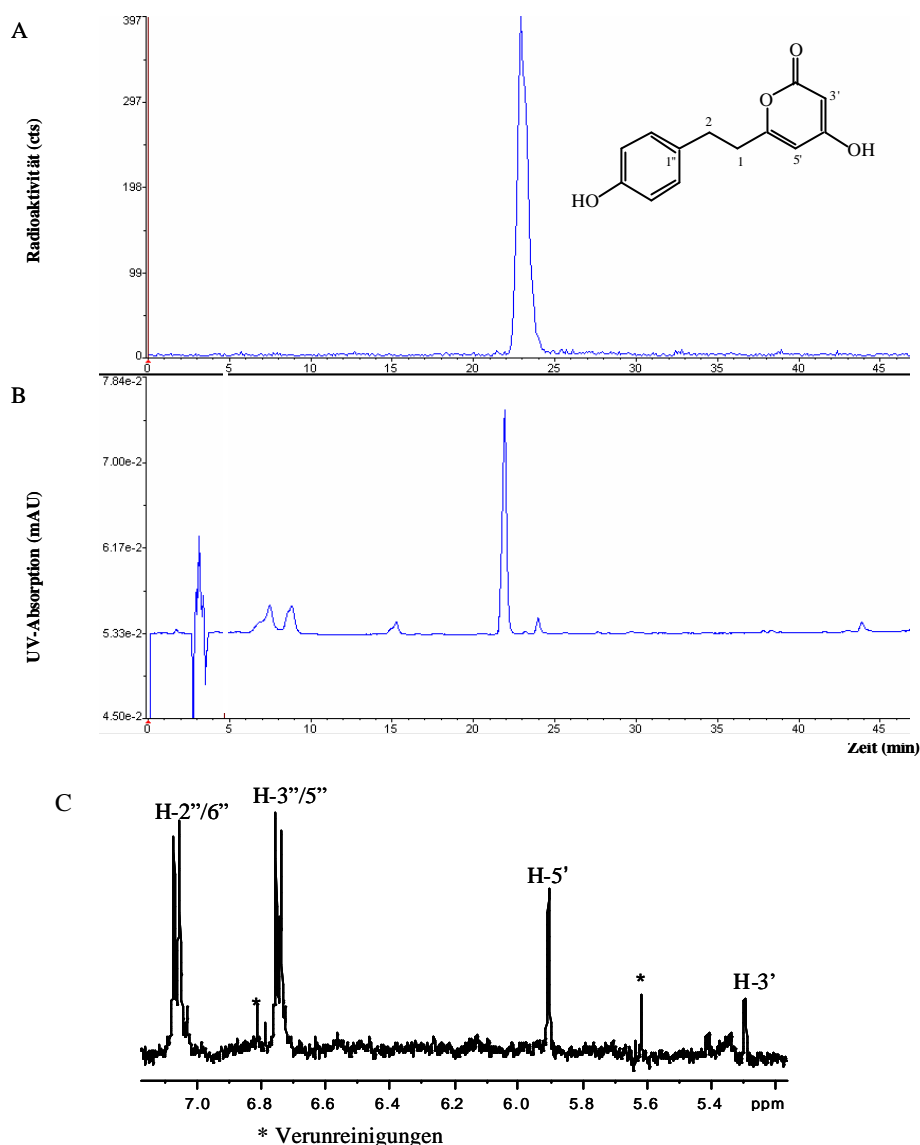


Abb. 3.17: 6-(4-Hydroxyphenethyl)-4-hydroxy-2H-pyran-2-on: A: Radioaktivitätsspur, B: UV-Spur des HPLC-Chromatogramms der Umsetzung von Dihydro-*p*-cumaroyl-CoA und Malonyl-CoA mit Wdf1. Enzymassay: 200  $\mu$ M Dihydro-*p*-cumaroyl-CoA, 80  $\mu$ M Malonyl-CoA, 3  $\mu$ l Proteinlösung, 37°C, 1 h, 0.1 M HEPES, pH 6.85. HPLC: Gradient A. C: NMR-Spektrum dieses enzymatischen Produktes. Einschub in A: Strukturformel des Produktes.

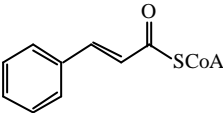
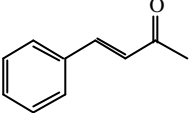
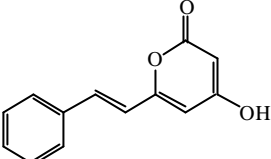
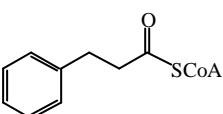
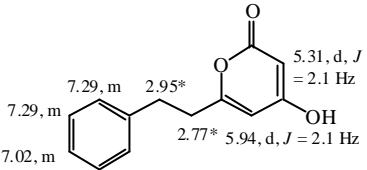
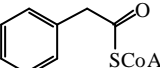
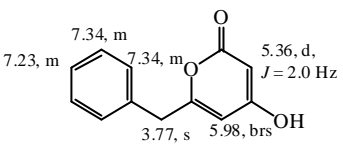
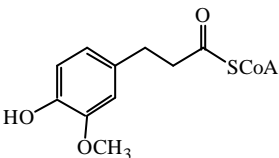
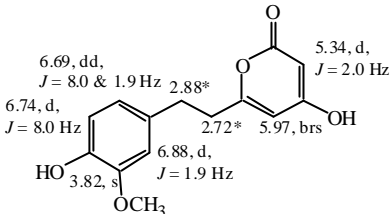
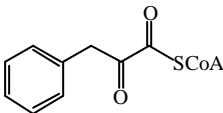
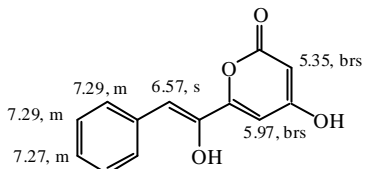
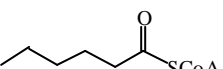
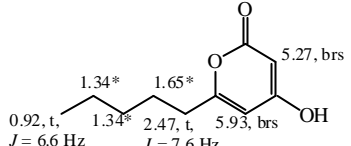
Wie in Abschnitt 3.2.3.2 bereits beschrieben, war das Enzym Wdf1 mit einer großen Bandbreite von Substraten aktiv. Um nachzuweisen, dass das Enzym auch mit den anderen Startern 2-Ketone und Pyrone produziert, wurden die Produkte einer Reihe weiterer Starter-CoA-Ester NMR-spektroskopisch und massenspektrometrisch untersucht. Dabei wurden die in Tabelle 3.1 durch Retentionszeit, MS-Daten und <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum charakterisierten Produkte mit den verwendeten Startern erhalten. Wie aus dieser Abbildung ersichtlich,

wurden auch hier die Produkte von einer (2-Ketone) oder zwei Kondensationen (Pyrone) erhalten.

Der Einsatz der Diketid-NAC-Derivate im Enzymassay mit Malonyl-CoA als Kettenverlängerer führte ebenfalls zu radioaktiv markierten Produkten. In Abb. 3.18 wurden Radio-HPLC-Chromatogramme der Enzymassays von Dihydrozimtsäure-diketid-NAC (Abb. 3.18 A) und Dihydrocinnamoyl-CoA (Abb. 3.18 B) mit Malonyl-CoA gegenübergestellt. Es wurde jeweils ein Produkt detektiert, das in beiden Fällen dieselbe Retentionszeit aufwies. Tabelle 3.2 stellt die Retentionszeiten der Produkte aller vier verwendeten Diketid-NAC-Derivate den Retentionszeiten der jeweiligen CoA-Ester gegenüber. Die Retentionszeiten der Produkte, die mit Diketid-NAC-Estern vom Enzym gebildet wurden, waren identisch mit den Retentionszeiten der Verbindungen, die mit CoA-Derivaten vom Enzym gebildet wurden. Es handelte sich somit bei den Produkten der Diketid-NAC-Derivate um dieselben Produkte, die Pyrone, wie bei den CoA-Derivaten.

Abb. 3.18 C zeigt das Radio-HPLC-Chromatogramm der Umsetzung von Dihydrocinnamoyl-CoA mit Methylmalonyl-CoA. Das in diesem Chromatogramm detektierte Enzymprodukt eluierte bei etwas höheren Acetonitrilkonzentrationen als 4-Hydroxy-6-phenethyl-2*H*-pyran-2-on, das Produkt der Umsetzung von Dihydrocinnamoyl-CoA mit Malonyl-CoA. Es handelt sich hierbei vermutlich um das Dimethylpyron (4-Hydroxy-3,5-dimethyl-6-phenethyl-2*H*-pyran-2-on). Bei Einsatz von Cinnamoyl-CoA und Methylmalonyl-CoA im Enzymassay wurden zwei Produkte nachgewiesen, die ebenfalls ca. 4 min später eluierten als die Produkte der Umsetzung von Cinnamoyl-CoA mit Malonyl-CoA (Tabelle 3.2). Dabei handelte es sich vermutlich um (1'*E*)-4-Hydroxy-3,5-dimethyl-6-styryl-2*H*-pyran-2-on und (4*E*)-1-Phenylpent-4-en-3-on.

Tabelle 3.1: Produkte der enzymatischen Umsetzung verschiedener Starter-CoA-Ester. Analytische Daten: HPLC-Gradient A, HPLC-ESI-MS und <sup>1</sup>H-NMR-Signale. \*Daten aus hCOSY.

| Substrate (Starter-CoA-Ester)   | 2-Ketone  | Produkte  |
|---|---|---|
|   |   | Pyrone  |
| <br>Cinnamoyl-CoA          | <br>(3E)-4-Phenyl-but-3-en-2-on<br>$R_t = 33.1 \text{ min}$<br>$m/z 147 [M+H]^+$ | <br>(1E)-4-Hydroxy-6-styryl-2H-pyran-2-on<br>$R_t = 35.1 \text{ min}$ ,<br>$m/z 215 [M+H]^+$ , 169, 141, 131, 91, 69                  |
| <br>Dihydrocinnamoyl-CoA   |   | <br>4-Hydroxy-6-phenethyl-2H-pyran-2-on<br>$R_t = 28.0 \text{ min}$ , $m/z 217 [M+H]^+$ , 125, 105, 91                                |
| <br>Phenylacetyl-CoA       |   | <br>6-Benzyl-4-hydroxy-2H-pyran-2-on<br>$R_t = 24.5 \text{ min}$ , $m/z 203 [M+H]^+$ , 129, 111, 91                                  |
| <br>Dihydroferuloyl-CoA  |   | <br>4-Hydroxy-6-[2-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-ethyl]-2H-pyran-2-on,<br>$R_t = 19.5 \text{ min}$ , $m/z 263 [M+H]^+$ , 137, 111    |
| <br>Phenylpyruvatoyl-CoA |   | <br>(2'E)-4-Hydroxy-6-(1-hydroxy-2-phenyl-vinyl)-2H-pyran-2-on<br>$R_t = 24.4 \text{ min}$ , $m/z 231 [M+H]^+$ , 171, 139, 111, 101 |
| <br>n-Hexanoyl-CoA       |   | <br>4-Hydroxy-6-pentyl-2H-pyran-2-on<br>$R_t = 29.0 \text{ min}$ , $m/z 181 [M]^+$  |

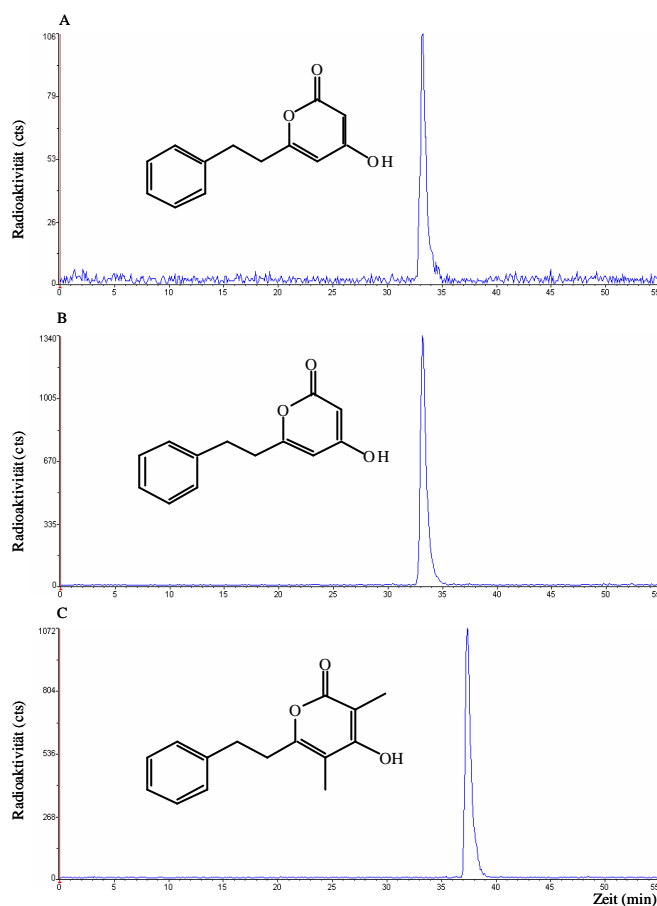


Abb. 3.18: Radio-HPLC-Chromatogramme zum Vergleich der Produkte folgender Enzymsätze mit Wdf1:

A) Dihydrozimtsäure-Diketid-NAC mit Malonyl-CoA

B) Dihydrocinnamoyl-CoA mit Malonyl-CoA

C) Dihydrocinnamoyl-CoA mit Methylmalonyl-CoA

Es wurden 100  $\mu$ M Starter, 80  $\mu$ M Malonyl-CoA oder 56  $\mu$ M Methylmalonyl-CoA und 3  $\mu$ l Enzymlösung verwendet, Inkubation 30 min, 37°C in 0.1 M HEP ES pH 6.85, HPLC-Gradient A.

Tabelle 32: Vergleich der Retentionszeiten der Produkte von Diketid-NAC- und CoA-Derivaten (Starter) mit Malonyl-CoA bzw. Methylmalonyl-CoA als Verlängerer. Enzymsätze: siehe Abb. 3.18.

| Starter                                 | <u>Verlängerer</u> |          |                          |          |
|---|--------------------|----------|--------------------------|----------|
|   | Produkt            |          |                          |          |
|   | <u>Malonyl-CoA</u> |          | <u>Methylmalonyl-CoA</u> |          |
|   | 2-Keton            | Pyron    | 3-Keton                  | Pyron    |
| Dihydrocinnamoyl-Diketid-NAC            |                    | 33.2 min |                          |          |
| Dihydrocinnamoyl-CoA                    |                    | 33.2 min |                          | 37.4 min |
| Dihydro- <i>p</i> -cumaroyl-Diketid-NAC |                    | 22.0 min |                          |          |
| Dihydro- <i>p</i> -cumaroyl-CoA         |                    | 22.0 min |                          | 26.4 min |
| Cinnamoyl-Diketid-NAC                   |                    | 35.3 min |                          |          |
| Cinnamoyl-CoA                           | 33.1 min           | 35.3 min | 37.5 min                 | 40.5 min |
| <i>p</i> -Cumaroyl-Diketid-NAC          |                    | 26.0 min |                          |          |
| <i>p</i> -Cumaroyl-CoA                  |                    | 26.0 min |                          | 30.9 min |

Zusammenfassen lassen sich die Ergebnisse dieses Abschnitts wie folgt: Das Enzym Wdf1 ist in der Lage Phenylpropanoid- und eine Reihe weiterer Starter-CoAs umzusetzen. Dabei werden eine oder zwei Kondensationen mit Malonyl-CoA durchgeführt und 2-Ketone und



Pyrone gebildet. Die Suche nach Diarylheptanoiden in den Enzymassays hatte jedoch keinen Erfolg.

#### 3.2.3.4 Enzymkinetische Konstanten des Enzyms Wdf1

Der kinetische Ablauf einer enzymatischen Reaktion kann aufgrund der vielfältigen Möglichkeiten, chemische Gleichgewichte einzustellen, sehr kompliziert sein, vor allem, wenn mehrere Substrate und Produkte involviert sind. Daher sind einzelne Geschwindigkeitskonstanten nur in sehr speziellen Fällen zu ermitteln. Zumeist lassen sich lediglich Produkte verschiedener Geschwindigkeitskonstanten bestimmen, das jedoch auch nur unter festgelegten Bedingungen. Um Enzyme trotzdem miteinander vergleichen zu können, hat sich die Anwendung der Michaelis-Menten-Kinetik bewährt. Diese gilt jedoch nur für den Abschnitt im Verlauf einer Enzymreaktion, in welcher die Substratkonzentration wesentlich höher als die Enzymkonzentration ist und mithin die Bindungsstellen aller Enzymmoleküle besetzt sind (steady state). Dabei können zwei Konstanten bestimmt werden: (1) der  $K_m$ -Wert (Michaelis-Konstante), der ein Produkt der beteiligten Assoziations- und Dissoziationskonstanten darstellt und (2) der  $k_{kat}$ -Wert (Wechselzahl), der die Anzahl der pro Enzymmolekül umgesetzten Substratmoleküle in einer bestimmten Zeit angibt.

Zur Bestimmung von  $K_m$ - und  $k_{kat}$ -Werten des Enzyms Wdf1 wurde die Konzentration des zu bestimmenden Substrates unter Verwendung der Sättigungskonzentration des jeweils anderen Substrates (100  $\mu$ M) im Konzentrationsbereich zwischen 2 und 40  $\mu$ M variiert. Zur Bestimmung der Konstanten der Starter-CoA-Ester wurde die Konzentration von Malonyl-CoA, zur Bestimmung von Malonyl-CoA-Konstanten die Dihydrocinnamoyl-CoA-Konzentration konstant gehalten. Die Proteinkonzentration (6  $\mu$ g = 1.4  $\mu$ M bei Substraten mit denen das Enzym hohe Aktivität zeigt, 9  $\mu$ g = 2.1  $\mu$ M bei weniger hoher Aktivität), Temperatur (37°C), Puffer (0.1 M HEPES, pH 6.85) und Inkubationszeit (30 oder 40 min, je nach Höhe der Aktivität) wurden konstant gehalten. Es wurden mindestens drei unabhängige Bestimmungen durchgeführt (Tabelle 3.3: Mittelwerte der Bestimmungen mit Standardabweichungen). Dabei traten einige systematische Probleme auf. Die hier verwendete Methode der Endproduktbestimmung der enzymatischen Konstanten ist nicht so gut geeignet wie eine Initialgeschwindigkeitsmessung. Dies liegt daran, dass bei der Endproduktbestimmung nur ein Datenpunkt zur Verfügung steht, der außerdem auch erst nach längerer Inkubationszeit ermittelt wird. Bei der Initialgeschwindigkeitsmessung wird dagegen der Umsatz von Substraten kurz nach Beginn der Enzymreaktion über einen gewissen Zeitraum verfolgt, sodass sichergestellt werden kann, dass die steady state-Bedingung erfüllt ist. Um zu gewährleisten, dass der Abbruch der Reaktion bei der hier verwendeten Methode

im steady state-Bereich erfolgte, wurden Kontrollexperimente mit Abbruch der Reaktion nach verschiedenen Inkubationszeiten durchgeführt. Ein weiteres Problem war die relative Unempfindlichkeit des Tests durch die Verdünnung des radioaktiven  $[2-^{14}\text{C}]\text{Malonyl-CoA}$  mit nichtmarkierten Molekülen (2.6.6). Dadurch war die Auswertung der erhaltenen Produktmengen bei Substraten, die nur schlecht durch das Enzym umgesetzt wurden, schwierig. Weiterhin war unklar, wie hoch der Anteil aktiver Enzymdimere am Gesamtprotein war. Trotz hohem Reinheitsgrad war es möglich, dass sich in der Präparation des Proteins auch inaktive Monomere und falsch gefaltete Moleküle befanden und damit die gemessene Proteinkonzentration deutlich über der Konzentration aktiver Moleküle lag.

Trotz aller Probleme ließen sich die  $K_m$ -Werte mit den in der Literatur beschriebenen Werten vergleichen und auch der Vergleich der kinetischen Konstanten der Substrate untereinander war ohne weiteres durchzuführen.

Tabelle 33: Enzymkinetische Konstanten des Enzyms Wdf1 mit verschiedenen Starter-CoAs.  $K_m$ : Michaelis-Konstante,  $k_{\text{kat}}$ : Wechselzahl,  $k_{\text{kat}}/K_m$ : katalytische Effizienz.

| Substrat                        | $K_m$ [ $\mu\text{M}$ ] | $k_{\text{kat}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ] | $k_{\text{kat}}/K_m$ [ $\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$ ] |
|---------------------------------|-------------------------|--|---|
| Dihydrocinnamoyl-CoA            | $40 \pm 7$              | $0.147 \pm 0.028$                      | 61.3  |
| <i>n</i> -Hexanoyl-CoA          | $61 \pm 13$             | $0.159 \pm 0.010$                      | 43.7  |
| Cinnamoyl-CoA                   | $28 \pm 6$              | $0.032 \pm 0.003$                      | 19.0  |
| Dihydro- <i>p</i> -cumaroyl-CoA | $14 \pm 2$              | $0.05 \pm 0.005$                       | 59.5  |
| <i>p</i> -Cumaroyl-CoA          | $85 \pm 13$             | $0.029 \pm 0.005$                      | 5.7   |
| Dihydroferuloyl-CoA             | $46 \pm 8$              | $0.0081 \pm 0.002$                     | 2.9   |
| Phenylpyruvatoyl-CoA            | $39 \pm 8$              | $0.042 \pm 0.004$                      | 17.9  |
| Phenylacetyl-CoA                | $104 \pm 26$            | $0.18 \pm 0.053$                       | 28.8  |
| Malonyl-CoA                     | $129 \pm 19$            | $0.423 \pm 0.045$                      | 54.7  |

Bei den Starter-CoA-Estern zeigte das Enzym die höchsten Wechselzahlen  $k_{\text{kat}}$  mit Dihydrocinnamoyl-CoA und *n*-Hexanoyl-CoA. Die Wechselzahl läßt sich aus dem Quotienten von Maximalgeschwindigkeit  $V$  und der Enzymkonzentration  $[E]$  berechnen. Beide Substrate wiesen auch in etwa dieselben  $K_m$ -Werte auf. Der  $K_m$ -Wert ergibt sich aus der Michaelis-Menten-Gleichung (Formel 3.1) als diejenige Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte ihres Maximalwertes beträgt. Da er das Produkt der Affinitäts- und Diffusionskonstanten der Enzymreaktion darstellt, ist er ein Hinweis auf die Affinität des Substrates zum Enzym. Je kleiner dieser Wert ist, umso höher ist die Affinität, umso schlechter löst sich das Substrat vom Enzym. Daher kann dieser Wert hoch sein, obwohl die Maximalgeschwindigkeit sehr niedrig ist, nämlich wenn das nicht umgesetzte Substrat wieder abdiffundiert. Dieses konnte hier bei Dihydroferuloyl-CoA gezeigt werden. Dessen  $K_m$ -Werte waren relativ hoch, die Wechselzahlen aber sehr niedrig.

$$v = \frac{V[A]}{K_m + [A]}$$

Formel 3.1: Michaelis-Menten-Gleichung,  $v$ : Reaktionsgeschwindigkeit,  $[A]$ : Substratkonzentration,  $K_m$ : Michaelis-Konstante,  $V$ : Maximalgeschwindigkeit

Der Wert  $k_{\text{kat}}/K_m$  (katalytische Effizienz) bezieht beide Werte ein. Er kann als Hinweis für die Substratspezifität angesehen werden. Je höher er ist, desto höher die Spezifität. Am höchsten ist dieser Wert bei Wdf1 für Dihydrocinnamoyl- und Dihydro-*p*-cumaroyl-CoA, welche damit die besten aromatischen Substrate für dieses Enzym sind. Dies bedeutet jedoch nicht auch gleichzeitig, dass es die natürlichen Substrate sind. Auch *n*-Hexamoyl-CoA ist ein Substrat mit dem das Enzym sehr hohe  $k_{\text{kat}}/K_m$ -Werte aufwies. Dies lag hier vermutlich an der Flexibilität der  $C_6$ -Kette dieses Substrates, die sich genauso falten konnte, dass in etwa derselbe Raum in der aktiven Tasche wie bei den aromatischen Substraten eingenommen wurde. Schon in früheren Publikationen wurde dieser Sachverhalt beschrieben <sup>[121]</sup>. Die Flexibilität von gesättigten Alkylketten kann auch eine Grund für die höheren Aktivitäten des Enzymes mit Dihydrocinnamoyl- und Dihydro-*p*-cumaroyl-CoA gegenüber den ungesättigten Analogen sein.

Vergleich man die  $k_{\text{kat}}/K_m$ -Werte der Starter-CoA-Ester von Wdf1 mit denen anderer Typ III-Polyketidsynthasen, so waren diese deutlich reduziert (Tabelle 3.4), obwohl sich die  $K_m$ -Werte, d.h. die Affinität des Proteins zu den Substraten nicht stark unterschieden. Deutlich niedriger als bei den Vergleichsenzymen war jedoch die Umsatzrate, d.h. die Wechselzahl  $k_{\text{kat}}$ . Diese hing im Gegensatz zum  $K_m$ -Wert von der eingesetzten Proteinkonzentration ab. Ein hoher Anteil nichtaktiver Moleküle in der Präparation könnte diesen Wert beeinflusst haben. Das Enzym weist für den Kettenverlängerer Malonyl-CoA die höchste Wechselzahl ( $k_{\text{kat}}$ ) auf. Der hohe  $k_{\text{kat}}$ -Wert ist insofern nicht verwunderlich, als bei den meisten Substraten zwei Malonyl-CoA-Einheiten pro Starter-CoA-Molekül umgesetzt wurden. Das ist z.B. bei der Biosynthese der Pyrone der Fall. Der  $K_m$ -Wert für Malonyl-CoA ist ausgesprochen hoch, d.h. dass die Affinität von Malonyl-CoA an das Enzym nicht sehr stark ist. Die  $k_{\text{kat}}/K_m$ -Werte der Starter-CoA und Malonyl-CoA als Kettenverlängerer lassen sich nicht miteinander vergleichen, da die Wechselzahlen nicht vergleichbar sind. Ebenso sind der  $k_{\text{kat}}/K_m$ -Wert von Malonyl-CoA dieses Enzymes nicht mit dem anderer Polyketidsynthasen des Typ III vergleichbar, da bei diesen unterschiedlich viele Kondensationen (z.B. drei bei CHS) durchgeführt werden.

Tabelle 3.4: Enzymatische Konstanten verschiedener Typ III-PKS mit ihren natürlichen Starter-CoAs.

| Enzym | Substrat                        | $K_m$ ( $\mu$ M) | $k_{\text{kat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ ) | $k_{\text{kat}}/K_m$ ( $\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) | Literatur |
|-------|---------------------------------|------------------|--|---|-----------|
| CHS   | <i>p</i> -Cumaroyl-CoA          | 6.1              | 5.14                                   | 1043  | [121]     |
| STS   | <i>p</i> -Cumaroyl-CoA          | 11.2             | 1.20                                   | 1785  | [122]     |
| BPS   | Benzoyl-CoA                     | 5.7              | 9.66                                   | 28345   | [91]      |
| BAS   | <i>p</i> -Cumaroyl-CoA          | 10.0             | 1.79                                   | 2963  | [123]     |
| 2PS   | Acetyl-CoA                      | 3.2              | 1.47                                   | 7656  | [124]     |
| ACS   | N-Methylantraniloyl-CoA         | 29.4             | 0.68                                   | 386   | [121]     |
| Wdf1  | Dihydro- <i>p</i> -cumaroyl-CoA | 14.0             | 0.05                                   | 16  |           |

### 3.3 Das Enzym Wdf2

#### 3.3.1 Das Gen *wdf2*

Da das Enzym Wdf1 unter den geprüften Bedingungen nicht in der Lage ist, Diarylheptanoide zu synthetisieren, wurde nach weiteren Typ III-Polyketidsynthasen gesucht. Außerdem war mittlerweile bekannt, dass bei Zugabe von Jasmonsäure oder Coronalon zu einer Wurzelkultur von *Wachendorfia thyrsiflora* besonders die Biosynthesen von Anigorufon und Methoxyanigorufon induziert werden. Anscheinend hat die Induktion also Einfluß auf die Biosynthese der Phenylphenalenone. Es sollte daher untersucht werden, inwiefern das schon auf den ersten Schritt der Biosynthese, die Bildung linearer Diarylheptanoide, zutrifft. Zu diesem Zweck wurde eine Wurzelkultur von *Wachendorfia thyrsiflora* geteilt und beide Hälften in frisches Medium überführt. Eine Hälfte wurde mit Coronalon (0.18 mM) behandelt, die andere blieb unbehandelt (Kontrolle). Von beiden wurde RNA gewonnen, cDNA synthetisiert und die interessierenden 600 bp-Fragmente in den Vektor pCR<sup>®</sup> II-TOPO<sup>®</sup> kloniert (wie in 3.2.1 beschrieben). Dabei wurde in der induzierten Kultur neben dem 600 bp-Fragment von Gen *wdf1* ein 600 bp-Fragment eines Gens *wdf2* gefunden, das etwa 80 % der PKS-Sequenzen ausmachte. In der nichtinduzierten Hälfte der Kultur stellte das Gen *wdf2* jedoch nur ein Drittel der sequenzierten PKS-Sequenzen. Von dem 600 bp-Fragment des Gens *wdf2* ausgehend, wurde wiederum durch 5'/3'-RACE (2.5.4) die mRNA-Sequenz von *wdf2* (im Anhang Abb. A3.2) erhalten.

#### 3.3.2 Die Expression des Proteins Wdf2

Aus der mRNA-Sequenz für das Gen *wdf2* (3.3.1) wurde die in Abb. 3.19 dargestellte Proteinsequenz abgeleitet. Dieses Protein hatte 389 Aminosäuren und eine relative Molekülmasse von 42812 Da. Circa 60 % der Aminosäuren dieses Proteins waren identisch mit denen in Chalconsynthasen, der Homologiegrad betrug ca. 77 %. Damit gehört auch dieses Protein Wdf2 zu den Typ III-Polyketidsynthasen, ist jedoch von der

Aminosäuresequenz her keine typische Chalconsynthase. Mit Wdf1 weist dieses Protein 58 % identische Aminosäuren auf.

```
MLNIKEFRKAQRAQGPATVMAIGTANPDNIVDQSTYADYYFRVTNSENKPDLLKKKFQRICDRSGIKKRHIFVTEE
ILKQRPSMCGYMTQSFDRQDIVVDEVPKLAKIAAERALKWGRSKSELTHLVFCSTSGIDMPGADVQLIKLLDL
PLTINRTMLYCQACHMGASMMRIVKDLAENNKGARVLMVSSEITAHSGFRGPSQTNVPDLGGQATFADGAAALVVG
ADPIEGLEKPIFEVYYGAQTTMPDTPRAVGGHFEEVGLTFHTLPNLPQLVANNIGDCLMSAFKPTGITDWNKVFV
VLHPGNTAIMDAIQAKLGLPEKITASRKIFSEYGNMFSATVLFVMDQVRKESAAEGMSTTGHGLEWGVMFQFGP
GLSIETVVLRVSLSL
```

Abb. 3.19: Aus der mRNA (3.3.1, Abb. A3.2) vorhergesagte Proteinsequenz des Proteins Wdf2.

Das Protein wurde wie das Protein Wdf1 exprimiert (3.2.2). Zur Amplifikation und Klonierung in das Expressionsplasmid pHis8 wurden die Primer dhs34\_wdf\_chs2\_B und dhs35\_wdf-chs2\_H verwendet. Die Gewinnung des Proteins wurde ebenfalls wie bei Wdf1 durchgeführt und erzielte dieselben Resultate, sodass an dieser Stelle auf weitere Beschreibungen und Abbildungen verzichtet wird. Auch von diesem Protein wurde eine MALDI-TOF-MS und ESI-MS-Untersuchung durchgeführt, um die korrekte Translation des Proteins mit His-Tag zu bestätigen (Anhang: Tabelle A4.3). Das Protein mit His-Tag wies eine Gesamtgröße von 45100 Da auf. Die Fragmente deckten 56 % der Gesamtsequenz ab und bewiesen damit, dass die translatierte Sequenz mit der aus der Gensequenz vorhergesagten Sequenz übereinstimmt.

### 3.3.3 Enzymatische Aktivität des Proteins Wdf2

Obwohl sich dieses Enzym ohne weiteres in großen Mengen reinigen ließ, konnte mit keinem der verwendeten Substrate eine Aktivität festgestellt werden. Es wurden dabei auch die Inkubationstemperatur im Bereich von 30 - 37°C und der pH-Wert des Puffers in HEPES- (5.5 - 7), Phosphat- (6 - 7.5) oder Trispuffer (8 - 8.7) variiert. Dafür wurden als Starter *n*-Hexanoyl-CoA und Dihydrocinnamoyl-CoA verwendet. Außerdem wurde Malonyl-CoA durch Methylmalonyl-CoA ersetzt. Dieses Enzym zeigte jedoch in keinem Fall Aktivität. Der Versuch Acetyl-CoA als Starter oder Verlängerer einzusetzen, führte ebenfalls nicht zu Enzymprodukten. Es wurde auch keine Aktivität gemessen, wenn Diketid-NAC-Derivate zusammen mit Phenylpropanoyl-CoAs oder wenn die Proteine Wdf2 und Wdf1 zusammen im Enzymassay eingesetzt wurden.

### 3.4 Das Enzym Wdf3

#### 3.4.1 Das Gen *wdf3* in einer cDNA-Bank

Ein erster Hinweis auf ein drittes Gen *wdf3* wurde bereits bei der 3'-RACE des Gens *wdf2* erhalten. Eine der Sequenzen wies deutliche Unterschiede zu den anderen auf. Allerdings konnte kein spezifisches 5'-Ende für diese Sequenz gefunden werden.

Um zu untersuchen, ob diese Sequenz tatsächlich eine weitere PKS darstellt, und um sicherzugehen, dass alle PKS-ähnlichen Sequenzen in *Wachendorfia thyrsiflora* gefunden worden waren, wurde durch die Firma vertis Biotechnologie AG, Freising, in unserem Auftrag eine cDNA-Bank synthetisiert. Dazu wurde die RNA der mit Coronalon induzierten *Wachendorfia thyrsiflora*-Wurzelkultur (3.3.1) verwendet. Die aus der mRNA gewonnene cDNA wurde in den Vektor pExCell kloniert. Anschließend erfolgte die Verpackung der erhaltenen Vektorkonstrukte als Konkatemere (lineare Vektoren mit vielen Replikaten des Vektors pExCell und der darin klonierten cDNA) in Phagenhüllen und die Infektion von *E. coli* NM522 mit den erhaltenen Phagen. Die Phagen, die nach dieser Infektion gewonnen wurden (Primärbibliothek), wurden anschließend von uns nochmals vervielfältigt (2.5.9.4).

Zur Untersuchung der cDNA-Bank wurden zunächst die Gene *wdf1*, *wdf2* und *wdf3* durch PCR amplifiziert. Für die Sonde von *wdf3* wurden als Primer zur PCR-Amplifikation ein spezifischer 3'-Primer von *wdf3* und ein 5'-Primer von *wdf2* verwendet, da kein spezifischer 5'-Primer zur Verfügung stand. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden aus einem Gel gereinigt (2.5.5). Zur Synthese der Sonde wurde eine Mischung aller drei Fragmente in gleichen Mengen verwendet. Das Screening erfolgte bei 58°C wie in 2.5.9.5 beschrieben.

Von den erhaltenen positiven Klonen wurden insgesamt 112 Kolonien sequenziert. Davon enthielten 79 Polyketidsynthasene. Diese wiederum gliederten sich in 13 Kolonien mit *wdf1*, 60 Kolonien mit *wdf2*, 5 Kolonien mit *wdf3* und bei 3 Kolonien konnte nicht sicher zwischen *wdf2* und *wdf3* unterschieden werden, da die betreffenden Sequenzen zu kurz waren. Die Sequenzen der bereits zuvor bekannten Gene *wdf1* und *wdf2* konnten hier eindeutig bestätigt werden.

In einem zweiten Ansatz wurden zwei Sonden hergestellt, eine für *wdf1* und eine für *wdf2*. Die Hybridisierungstemperatur betrug in diesem Falle 48°C statt der zuvor verwendeten 58°C. Dabei zeigte sich, dass die Sonde für *wdf1* nur *wdf1*-Gene erkannte, die Sonde für *wdf2* jedoch *wdf2* und *wdf3*.

Insgesamt wurde jedoch nur ein Volllängeklon für *wdf3* gefunden. Diese Sequenz wurde amplifiziert und in den Vektor pCR® II-TOPO® kloniert. Als dieser sequenziert wurde, zeigte sich, dass ein Basenaustausch vorhanden war, der zu einem Stop-Codon führte. Dieser konnte

zuvor nicht erkannt werden, da die Sequenzierung vom 3'-Ende durch den Poly-T-Schwanz der cDNA erschwert wurde. Da durch die anderen vorhandenen 3'-terminalen Sequenzen ausgeschlossen werden konnte, dass es sich um das wirkliche Ende des Proteins handelte, wurde eine Punkt-Mutagenese mit Hilfe des QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene durchgeführt. Dieser beruhte auf der Amplifikation beider Stränge mit überlappenden Primern, welche die Mutation enthielten. Anschließend wurde die durch Klonierung in *E. coli* Top10F' methylierte Eltern-DNA abgebaut. Das Ligieren der beiden Stränge erfolgte dann durch Reparaturenzyme des Stammes (hier *E. coli* TOP10F'), in den die Tochterstrang-DNA kloniert wurde. 50 % der Sequenzen enthielten anschließend die Mutation. Damit ergab sich die Sequenz für das Gen *wdf3* wie im Anhang (Abb. A3.3) gezeigt.

### 3.4.2 Die Expression des Proteins Wdf3

Aus der in Abb. A3.3 gezeigten DNA-Sequenz wurde die in Abb. 3.20 dargestellte Proteinsequenz vorhergesagt. Es handelte sich um ein 43188 Da großes Proteinmonomer mit 391 Aminosäuren.

```
MANNIKELRKAQRAQGPATVMAIGTANPDNIVDQSTYADYYFRITNSEHKPELKKKFQRICDRSGIKKRHIFVTE
EILKQRPSMCGYMTQSFDRQDIVVEVPKLAKIAAERALKKEWGRPKSELTHLVFCSTSGIDMPGADVQLIKLLD
LPLNINRVMLYCQACHMGASMMRIVKDLAENKNGARVLMVSSEITAHSEFRGPSETNVPDLGGQATFADGAAALVV
GADPIEGLEKPIFEVYYGAQTTPDTPRA VGGHFEQVGLTFHTLPNLPQLVANNIGNCLMTAFKPTGITDWNKVF
WVLHPGNSAIMDAVQVKLGLQPEKIRTSRKIFSEYGNMFSATVLFVMDQVRKESAAEGFSTTGHGHEWGMFGFG
PGLSIETVVLRSVSLN
```

Abb. 3.20: Aus der DNA-Sequenz (3.4.1, Abb. A3.3) vorhergesagte Proteinsequenz des Proteins Wdf3.

Das Protein Wdf3 weist wie auch die anderen Proteine 60 % identische Aminosäuren und einen Homologiegrad von 77 % zu Chalconsynthasen auf. Die Identität mit Wdf1 beträgt 58 %, mit Wdf2 sind dagegen 95 % aller Aminosäuren identisch.

Die Klonierung des Proteins Wdf3 erfolgte wie bei Wdf1 und Wdf2 in das Expressionsplasmid pHis 8 (3.2.2). Für das Protein Wdf3 ließ sich zwar der Nachweis der Expression (im Pellet, 1. Bande in Abb. 3.21) führen, jedoch wurde nur eine geringe Menge des Proteins nach der Affinitätschromatographie-Säule erhalten (Abb. 3.21). Dies war vermutlich auf eine geringe Löslichkeit des Proteins zurückzuführen. Dadurch fiel das Protein auf der Säule aus und wurde nur spurenweise und verschmiert eluiert. Da der Rohextrakt eine höhere Aktivität als die gereinigte Fraktion hatte, wurde auf eine Reinigung verzichtet und alle enzymatischen Versuche am ungereinigten Protein durchgeführt. Das exprimierte Protein Wdf3 hat eine Gesamtgröße mit His-Tag von 45475 Da.

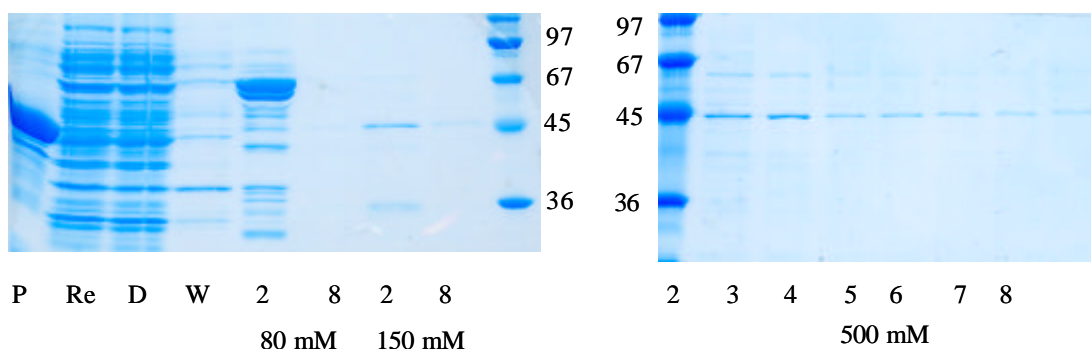


Abb. 3.21: Elektrophoresegel des Reinigungsversuchs des Proteins Wdf3 mit der Affinitätschromatographie: Re: Rohextrakt, D: Durchlauf (nicht gebundenes Protein), Fraktionen 2 und 8 der Elution mit 80 mM Imidazol, Fraktionen 2 und 8 der Elution mit 150 mM Imidazol, Fraktionen 2 - 8 der Elution mit 500 mM Imidazol.

Um zu bestätigen, dass das Protein korrekt translatiert wurde, wurden auch in diesem Fall massenspektrometrische (MALDI-TOF, ESI) Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurde sowohl die Expressionsbande im Pellet als auch die gereinigte Bande bei 45 kDa und weitere Banden in der Präparation des gereinigten Proteins untersucht. Die Bande im Pellet konnte eindeutig als das gesuchte Protein nachgewiesen werden (Tabelle A4.4). Es wurde 63 % der Proteinsequenz abgedeckt. Dabei wurde auch ein Fragment des His-Tags nachgewiesen, welches aber nicht sicher diesem Protein zugewiesen werden konnte. Der Grund dafür liegt in Vorhandensein weiterer Proteine im nichtaufgereinigtem Pellet. Auch die gereinigte Bande konnte als das gesuchte Protein bestätigt werden. Weiterhin befanden sich in der Präparation des gereinigten Proteins auch Abbauprodukte des gesuchten Proteins. Bei einem dieser Abbauprodukte konnte der His-Tag eindeutig nachgewiesen werden. Damit ist davon auszugehen, dass Wdf3 korrekt exprimiert wurde und auch den His-Tag enthält. Die schlechte Reinigung ist daher vermutlich tatsächlich auf eine geringe Löslichkeit des Proteins zurückzuführen und nicht etwa auf einen fehlenden His-Tag.

### 3.4.3 Enzymatische Aktivität des Proteins Wdf3

Wie in 3.4.2 gezeigt, ließ sich das Protein Wdf3 nicht gut reinigen. Es zeigte jedoch als gereinigtes Protein und als Rohextrakt Aktivität mit *n*-Hexanoyl-CoA. Der Rohextrakt war jedoch deutlich aktiver als die gereinigte Fraktion, sodass alle Enzymtests mit dieser Präparation durchgeführt wurden. Dadurch war es jedoch nicht möglich, kinetische Konstanten für dieses Enzym zu bestimmen. Eine Gegenüberstellung der Radio-HPLC-Chromatogramme der Umsetzung von *n*-Hexanoyl-CoA mit Malonyl-CoA und den Proteinen Wdf1 und Wdf3 zeigte, dass die  $R_f$ -Werte der Produkte identisch waren. Das Produkt stellte damit vermutlich 4-Hydroxy-6-pentyl-2H-pyran-2-on (Abb. 3.22) dar, also das Pyron aus der Kondensation von *n*-Hexanoyl-CoA mit zwei Malonyl-CoA. Bei weiteren Untersuchungen



wurde auch ein polareres Produkt festgestellt. Dabei handelte es sich vermutlich um 2-Heptanon, das Produkt nach der ersten Kondensation, da es nur eine Minute früher eluierte als das Pyron. Damit verhält es sich genauso wie *p*-Hydroxybenzalaceton gegenüber dem *p*-Hydroxystyrylpyron. Desweiteren wurde Aktivität mit *n*-Heptanoyl- und *n*-Octanoyl-CoA nachgewiesen, sowie mit Propionyl-CoA, *n*-Butyryl-CoA und *n*-Valeroyl-CoA. Die Produkte mit *n*-Butyryl-CoA und Propionyl-CoA wurden durch HPLC-ESI-MS ebenfalls als Pyrone (6-Ethyl-4-hydroxy-2*H*-pyran-2-on:  $m/z$  141  $[M+H]^+$ , 126, 123, 113, 95, 87, 77, 67 und 4-Hydroxy-6-propyl-2*H*-pyran-2-on:  $m/z$  155  $[M+H]^+$ , 137, 126, 113, 109, 91, 87, 81, 69) bestimmt (Abb. 3.23). Das Enzym war inaktiv mit allen aromatischen Startern.

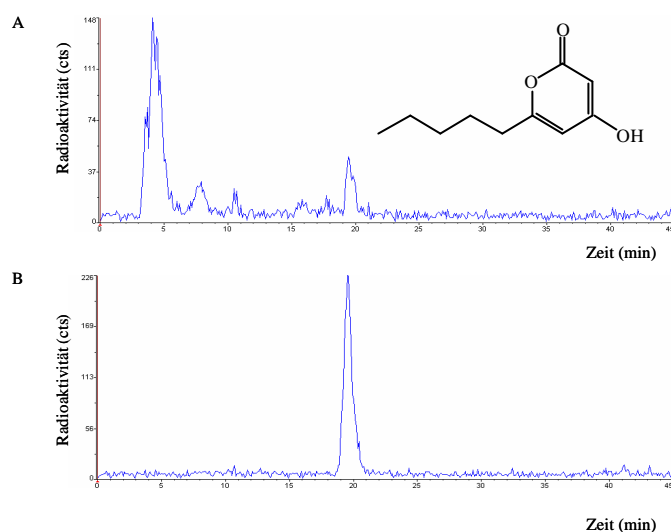


Abb. 3.22: Radio-HPLC-Chromatogramm der Umsetzung von *n*-Hexanoyl-CoA (100  $\mu$ M) mit Malonyl-CoA (80  $\mu$ M) durch die Proteine Wdf3 (A, mit Einschub der Formel von 4-Hydroxy-6-pentyl-2*H*-pyran-2-on) und Wdf1 (B), Inkubation: 3 h, 37°C, HPLC-Gradient B.

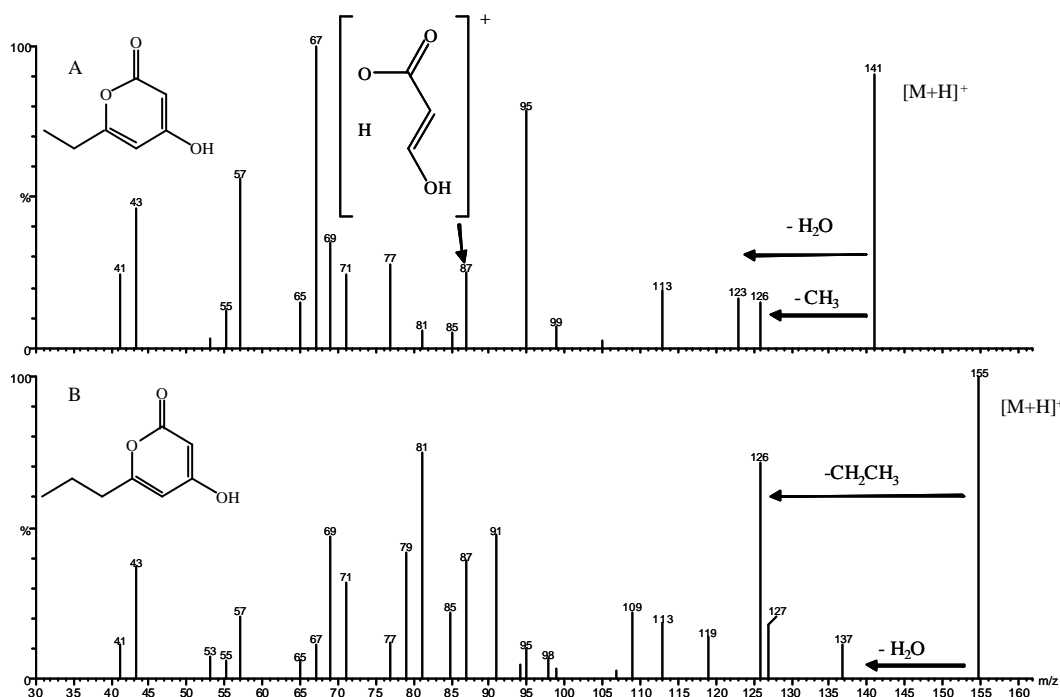


Abb. 3.23: HPLC-ESI-MS/MS-Spektren der Enzymprodukte von Wdf3. A: 6-Ethyl-4-hydroxy-2H-pyran-2-on, B: 4-Hydroxy-6-propyl-2H-pyran-2-on.

Das Enzym hatte sein Temperaturoptimum für die Bildung von 4-Hydroxy-6-pentyl-2H-pyran-2-on und dem vermutlichen *n*-Heptan-2-on aus *n*-Hexanoyl-CoA bei 34°C, der optimale pH-Wert lag bei 6.1 in HEPES-Puffer (0.1 M). Beide Werte waren deutlich niedriger als bei Wdf1 (37°C und pH 6.85 in 0.1 M HEPES).

### 3.5 Vergleich der Typ III-Polyketidsynthasen aus *Wachendorfia thyrsiflora*

#### 3.5.1 Vergleich der drei gefundenen Proteine mit anderen Typ III- Polyketidsynthasen

Wie bereits beschrieben, waren die Aminosäure-Sequenzen der Proteine Wdf1 und Wdf2 beziehungsweise Wdf1 und Wdf3 jeweils zu 58 % identisch (Homologiegrad 76%). Dagegen waren bei Wdf2 und Wdf3 95 % aller Aminosäuren identisch. In Abb. 3.24 ist ein Vergleich dieser Proteine mit weiteren Vertretern der Typ III-Polyketidsynthase-Familie dargestellt. Üblicherweise orientiert sich die Nummerierung der Aminosäuren an der Chalconsynthase aus *Medicago sativa*, die Darstellung in Abb. 3.24 jedoch an der 2-Pyronsynthase, sodass sich Unterschiede bei der Nummerierung ergaben. Beim folgenden Vergleich wurde daher die Nummerierung der CHS aus *Medicago sativa* verwendet und die in der Abb. 3.24 vorhandene Nummerierung von 2-Pyronsynthase in Klammern ergänzt.

Der Homologiegrad in dieser Proteinfamilie ist sehr hoch. Das aktive Zentrum mit der Bindungsstelle für den Starter-CoA-Ester und der Zyklisierungstasche besteht bei diesen Proteinen aus ca. 12 Aminosäuren um die katalytischen Aminosäuren Cys164 (hier: 170), His303 (309) und Asp336 (342). Die Aminosäuren dieser katalytischen Triade sind in allen Proteinen konserviert. Weitere Aminosäuren der aktiven Tasche sind in den meisten Fällen dieselben: Met137 (143, Ausnahme Wdf1 und Stilbensynthase), Gly211 (217, Ausnahme 2-Pyronsynthase), Gly216 (224), Pro375 (381), Phe215 (221, Ausnahme: Benzalacetonsynthase), Phe265 (271, Ausnahme Acridonsynthase) und Gly256 (262, Ausnahme 2-Pyronsynthase). Drei weitere Aminosäuren des aktiven Zentrums weichen bei den Polyketidsynthasen aus *Wachendorfia thyrsiflora* von den in Chalcon- und Stilbensynthasen konservierten ab: Thr197 (203) in CHS wurde durch Serin in Wdf2 und Wdf3 bzw. Phenylalanin in Wdf1, Leucin in 2-Pyronsynthase und Cystein in Benzalacetonsynthase ersetzt. Das Ile254 (300) von CHS wurde zu Valin in allen drei Enzymen aus *Wachendorfia* und Methionin in 2-Pyronsynthase mutiert. Ser338 (344) ist durch Methionin in Wdf1, Phenylalanin in Wdf2 und Wdf3 sowie Isoleucin in der 2-Pyronsynthase ausgetauscht. Bemerkenswert ist auch der Austausch der Aminosäuren Thr132 (138) und Ser133 (139) durch Glycin und Alanin in Wdf1, da diese Aminosäuren vermutlich Einfluss auf die Bindung von *p*-Cumaroyl-CoA und die Zyklisierung zum Chalcon bei CHS haben. Auf die Bedeutung dieser und einiger weiterer Mutationen wird in der Diskussion (4.4) näher eingegangen.

Abb. 3.25 zeigt eine phylogenetische Analyse der Typ III-Polyketidsynthase-Familie. Deutlich sichtbar wurde, dass sich die Polyketidsynthasen mit ungewöhnlichen Funktionen wie Aloesonsynthase und 2-Pyronsynthase entfernt von den typischen Chalconsynthasen alle im oberen Teil des Phylogenesebaums gruppieren, während sich die Stilbensynthasen in mehreren Gruppen über den Baum verteilen. Dabei sind sich Stilbensynthasen einer Gattung untereinander ähnlicher als den Chalconsynthasen derselben Gattung. Jedoch sind Stilbensynthasen verschiedener Gattungen den Chalconsynthasen derselben Gattung ähnlicher als Stilbensynthasen einer anderen Gattung. Die Polyketidsynthasen mit ungewöhnlichen Funktionen bilden jedoch eine eigene Gruppe und sind den Chalconsynthasen derselben Art nicht sehr ähnlich. Die höchste Ähnlichkeit der drei *Wachendorfia*-Enzyme besteht zu den Enzymen Aloesonsynthase (*Rheum palmatum*) und den Chalconsynthase-ähnlichen Enzymen A, C und B aus *Ipomoea purpurea*, deren Funktionen noch nicht vollständig geklärt sind. Aloesonsynthase führt eine sehr ungewöhnliche Reaktion aus. Sie verwendet als Starter Acetyl-CoA und führt sechs Kondensationen mit Malonyl-CoA als Verlängerer mit anschließender Ringbildung durch <sup>[95]</sup>.

Abb.3.24: Vergleich der Primärsequenzen verschiedener Polyketidsynthasen. Es bedeuten: Wdf1, Wdf2, Wdf3 die in *Wachendorfia thyrsiflora* gefundenen Proteine, CHS: Chalconsynthase aus *Medicago sativa*, STS: Stilbensynthase aus *Arachis hypogea*, ACS: Acridonsynthase aus *Ruta graveolens*, 2PS: 2-Pyronsynthase aus *Gerbera hybrida*, BAS: Benzalacetonsynthase aus *Rheum palmatum*. Rot: Aminosäuren, die in allen hier gezeigten Polyketidsynthasen, blau: Aminosäuren, die in mehr als 50 % aller Fälle identisch bzw. hoch homolog sind. Gelb unterlegt: Aminosäuren des aktiven Zentrums, die in diesem Abschnitt näher erläutert wurden. In der Consensus-Sequenz bedeutet : !: I oder V, \$: L oder M, %: F oder Y, #: N, D, Q, E, B oder Z.

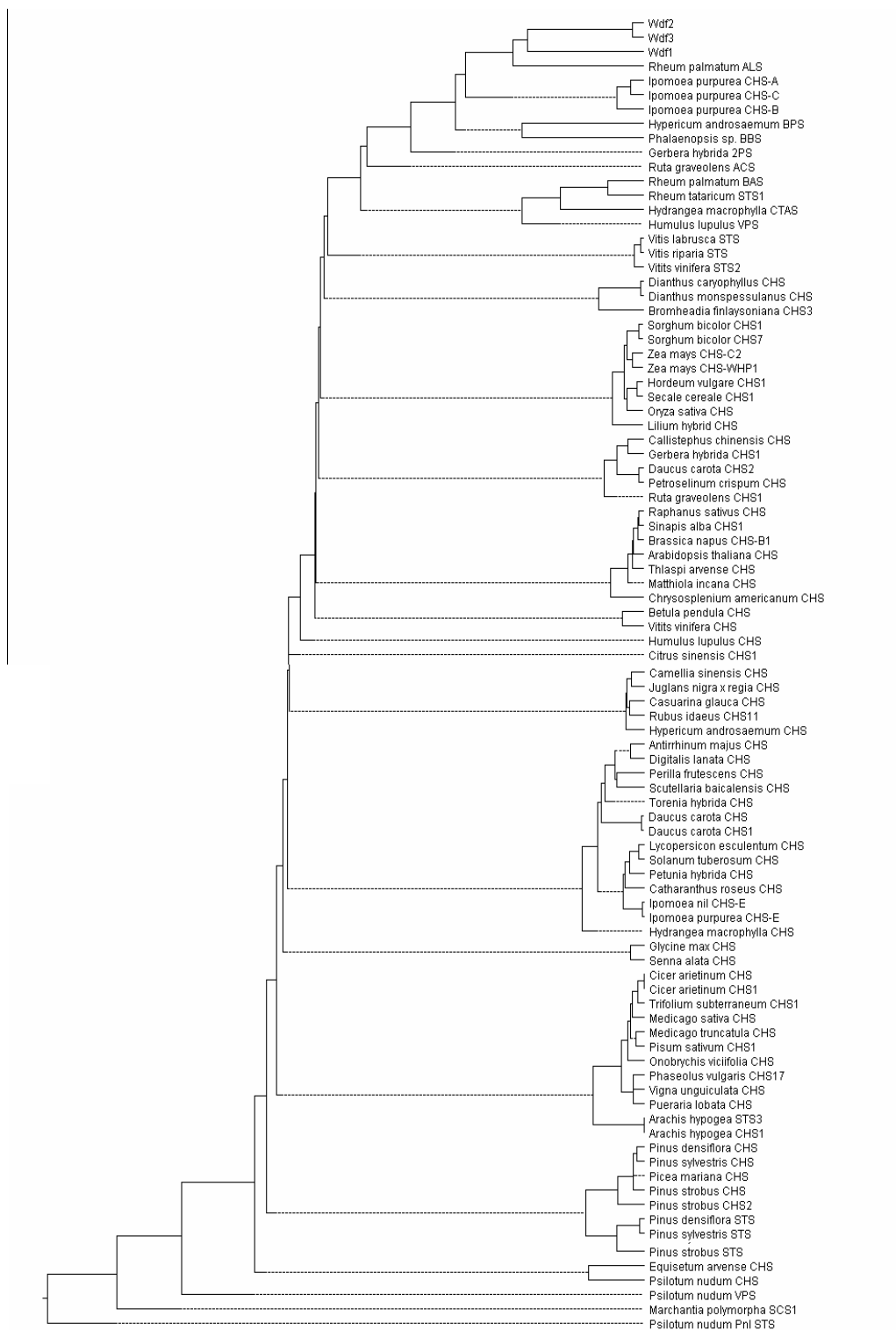


Abb. 3.25: Phylogenetische Analyse von pflanzlichen Polyketidsynthasen. Der Abgleich der Proteinsequenzen wurde mit dem Programm ClustalW durchgeführt. Abkürzungen: CHS: Chalconsynthase, STS: Stilbensynthase, VPS: Valerophenonsynthase, ACS: Acridonsynthase, ALS: Aloesonsynthase, 2PS: 2-Pyronsynthase, BBS: Bibenzylsynthase, BPS: Benzophenonsynthase, SCS: Stilbencarboxylatsynthase

### 3.5.2 Vergleich von Wdf2 und Wdf3

Vergleicht man die Sequenzen von Wdf2 und Wdf3, so ist der Unterschied zwischen beiden Sequenzen sehr klein (Abb. 3.26). Es sind 22 Aminosäuren ausgetauscht, was einem Identitätsgrad von 95 % entspricht. Einige dieser Aminosäuren ändern vermutlich die Aktivität des Proteins nicht, z.B. 2 Leu→Ala, 313 Ile→Val, 315 Ala→Val, da die strukturelle Ähnlichkeit dieser Aminosäuren sehr hoch ist. Da der N-Terminus in den Typ III-Polyketidsynthasen keine funktionelle Rolle spielt und daher nicht hoch konserviert ist, verursachen Änderungen der Sequenz in diesem Bereich vermutlich ebenfalls keine Aktivitätsänderungen. Der Austausch von Pro120 gegen Serin in Wdf2 scheint wesentlicher zu sein. In allen anderen Polyketidsynthasen des Typ III, inklusive Wdf1, war die Aminosäure 120 ein Prolin wie bei Wdf3. Prolin kommt normalerweise in Schleifen zwischen Helices oder Faltblättern vor. Ein Serin, wie es bei Wdf2 auftritt, könnte die Bildung dieser Schleife stören. An den Positionen 48 und 364 sind die Aminosäuren in Wdf3 dieselben wie in Wdf1 und unterscheiden sich von Wdf2. In Position 48 befindet sich in allen verglichenen Typ III-PKS ein Histidin und nur in Wdf2 ein Asparagin. In Position 364 ist Wdf3 identisch mit Wdf1 (Histidin). Wdf2 und alle in Abb. 3.24 aufgeführten Proteine enthalten an dieser Stelle ein Leucin. Wichtig ist auch die Mutation 325 Arg→Thr, da sich an dieser Stelle zumeist eine basische Aminosäure befindet (Arginin oder Lysin), in Wdf2 aber eine neutrale Aminosäure mit alkoholischer Hydroxylfunktion. Die drei Austausche bei den Positionen 48, 120 und 325 könnten also zumindest mittelbar für die fehlende Aktivität von Wdf2 verantwortlich sein.

Die geringe Löslichkeit von Wdf3 im Vergleich zu Wdf2 und Wdf1 konnte mit diesen Unterschieden leider nicht erklärt werden, da sich die Hydrophobizitäten der ausgetauschten Aminosäuren nicht wesentlich unterscheiden. Der Grund für die Unlöslichkeit bleibt damit unklar. Er muss jedoch in einer anderen Faltung, verursacht durch eine Sequenzänderung, liegen.

```

1  MLN-IKEFRKAQRAQGPATVMAIGTANPDNIVDQSTYADYYFRVTNSENK Wdf2
1  MANNIKELRKAQRAQGPATVMAIGTANPDNIVDQSTYADYYFRITNSEHK Wdf3

50  PDLKKKFQRICDRSGIKKRHIFVTEEILKQRPSMCGYMTQSFDRQDIVV Wdf2
51  PELKKKFQRICDRSGIKKRHIFVTEEILKQRPSMCGYMTQSFDRQDIVV Wdf3

100 DEVPKLAKIAAERALKEWGRSKSELTHLVFCSTSGIDMPGADVQLIKLLD Wdf2
101 EEVPKLAKIAAERALKEWGRPKSELTHLVFCSTSGIDMPGADVQLIKLLD Wdf3

150 LPLTINRTMLYCQACHMGASMMRIVKDLAENNKGARVLMVSSEITAHSFR Wdf2
151 LPLNINRVMLYCQACHMGASMMRIVKDLAENNKGARVLMVSSEITAHSFR Wdf3

200 GPSQTNVPDLGGQATFADGAAALVVGADPIEGLEKPIFEVYYGAQTTPD Wdf2
201 GPSETNVPDLGGQATFADGAAALVVGADPIEGLEKPIFEVYYGAQTTPD Wdf3

250 TPRAVGGHFE EVGLTFHTLPNLPQLVANNIGDCLMSAFKPTGITDWNKVF Wdf2
251 TPRAVGGHFE QVGLTFHTLPNLPQLVANNIGNCLMTAFKPTGITDWNKVF Wdf3

300 WVLHPGNTAIMDAIQAKLGLEPEKI TASRKIFSEYGNMFSATVLFVMDQV Wdf2
301 WVLHPGNSAIMDAVQVKLGLOPEKI RTSRKIFSEYGNMFSATVLFVMDQV Wdf3

350 RKESAAEGMSTTGHGLEWGV MFGFGPGLSIETVVLRSVSL Wdf2
351 RKESAAEGFSTTGHGHEWGV MFGFGPGLSIETVVLRSVSLN Wdf3

```

Abb. 3.26: Sequenzvergleich der Proteine Wdf2 und Wdf3. Gelb unterlegt wurden sich unterscheidende Aminosäuren

## **4. Diskussion**

### **4.1 Allgemeine Vorbemerkungen**

Diarylheptanoide spielen, wie schon in der Einleitung beschrieben, eine große Rolle in der Medizin. Für Curcumin z.B. wurde eine große Vielfalt medizinischer Wirkungen beschrieben<sup>[35]</sup>. Die meisten dieser Diarylheptanoide wurden gefunden, als man versuchte, die medizinische Wirkung von pflanzlichen Extrakten einer oder mehreren Substanzen zuzuordnen. Die eigentliche Funktion dieser Stoffe für die Pflanze ist jedoch eher unklar. So werden wie bei anderen phenolischen Naturstoffen z.B. Flavonoiden und Stilbenen schützende Wirkungen gegen Pathogene und UV-Licht vermutet. Eine Induktion von Phenylphenalenonen, einer zyklischen Untergruppe der Diarylheptanoide, konnte bei Schädlingsbefall in Bananen nachgewiesen werden<sup>[32]</sup>. Diese Stoffe sind also als Phytoalexine wirksam. Bei *Xiphidium caeruleum*, einer Pflanze, die vermutlich kaum Flavonoide bildet, wurden Phenylphenalene in der Blattepidermis gefunden<sup>[11]</sup>. Möglicherweise übernehmen diese Stoffe hier den Schutz gegen UV-Strahlung und ersetzen bzw. ergänzen die dafür bei anderen Pflanzen zuständigen Flavonoide.

Diarylheptanoide werden sowohl in Dikotyledonen als auch in Monokotyledonen gefunden. Allerdings enthalten nur wenige Gattungen der Monokotyledonen solche Verbindungen. Lineare Diarylheptanoide kommen nur in Zingiberaceae und vereinzelt in Haemodoraceae vor, während Phenylphenalene in den Musaceae, Haemodoraceae und Pontederiacae gefunden werden.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Biosynthese-Enzymen der Diarylheptanoide. Aus Fütterungsexperimenten ist bekannt, dass diese Stoffe aus zwei Phenylpropanoid-Molekülen und einer Acetat-Einheit biosynthetisiert werden (1.3.2 und 1.4.2). Die Synthese sollte also in zwei Schritten ablaufen:

- (1) Kondensation eines Phenylpropanoids („Starter“) mit der Acetat-Einheit („Verlängerer“).
- (2) Kondensation des dabei gebildeten Intermediates mit einer zweiten Phenylpropanoid-Einheit (im Folgenden als „Beender“ bezeichnet).

Prinzipiell könnte diese Biosynthese entweder durch ein Enzym oder durch zwei miteinander kooperierende Enzyme katalysiert werden. Die Klärung dieser Frage wird ein wesentlicher Bestandteil dieser Diskussion sein.

In dieser Arbeit wird davon ausgegangen, dass zumindest der erste Reaktionsschritt, die Kondensation eines Phenylpropanoids mit der Acetat-Einheit (in Form von Malonyl-CoA), von pflanzlichen Polyketidsynthasen des Typ III durchgeführt wird. Diese Enzymfamilie ist ubiquitär im Pflanzenreich vertreten. Die wichtigsten Vertreter sind die Chalcon- und



Stilbensynthasen. Eine Reihe weiterer ähnlicher Enzyme z.B. 2-Pyronsynthase, Aloesonsynthase und Benzophenonsynthase, die oftmals nur in einer oder wenigen Pflanzenarten vorkommen, hat sich vermutlich aus den Chalconsynthasen entwickelt (1.5.3). Dies könnte auch auf die hypothetischen Diarylheptanoidsynthasen zutreffen. Auch diese werden nur in wenigen, miteinander verwandten Gattungen gefunden.

Von Typ III-PKS ist bis jetzt nur die Kondensation von Starter-CoA-Estern mit Malonyl-CoA oder Methylmalonyl-CoA <sup>[125]</sup> bekannt. Gegenstand der Diskussion wird daher auch sein, ob PKS den zweiten Schritt durchführen können oder ob ein weiteres Enzym beteiligt ist. In letzterem Fall stellt sich die Frage nach der Natur dieses zweiten Enzyms.

## 4.2 Funktion der Typ III-Polyketidsynthasen in *Wachendorfia thyrsiflora*

### 4.2.1 Begriffsklärung

Zur Untersuchung der Frage, ob PKS des Typ III an der Biosynthese von Diarylheptanoiden beteiligt sind, wurden diese Enzyme in der Phenylphenalenone produzierenden Pflanze *Wachendorfia thyrsiflora* untersucht. Dabei wurde die mRNA von drei Polyketidsynthasen des Typ III gefunden. Da die Suche sowohl durch PCR-Amplifikation mittels degenerierter Primer als auch durch das Screening einer cDNA-Bank erfolgte, kann man davon ausgehen, dass in *Wachendorfia* keine weiteren Polyketidsynthasen exprimiert werden. Die folgenden Abschnitte beschäftigen sich mit den Aktivitäten der drei gefundenen Enzyme und den vermutlichen Funktionen dieser Enzyme in der *Wachendorfia thyrsiflora*-Zelle. In Abb. 4.1 wurden die Bedeutungen der in der Diskussion verwendeten Begriffe verdeutlicht.

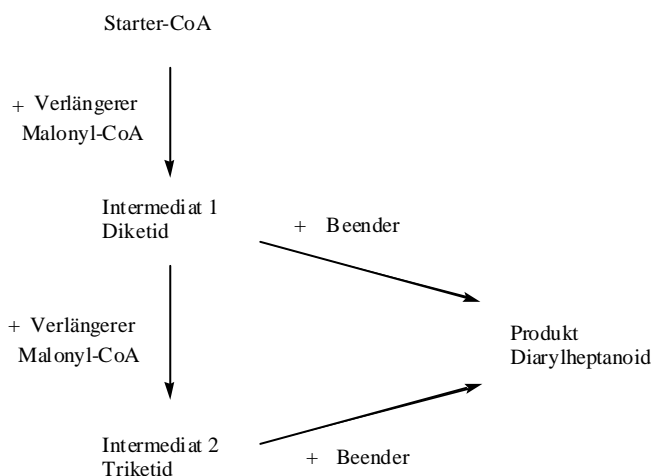


Abb. 4.1: Flussschema zur Diarylheptanoid-Biosynthese und Erläuterung der Begriffe für die daran beteiligten Substrate, Intermediate und Produkte.

### 4.2.2 Das Enzym Wdf1

Das Enzym Wdf1 verwendete CoA-Ester von Phenylpropanoiden (Starter) und führte eine oder zwei Kondensationen mit Malonyl-CoA durch. Bei nur einer Kondensation führte die Decarboxylierung des Intermediates 1 (Diketid) zur Bildung eines 2-Ketons, z.B. *p*-Hydroxybenzalaceton. Bei zwei Kondensationen wurde das Intermediat 2 (Triketid) zum Pyron, z.B. *p*-Hydroxystyrylpyron, zyklisiert (Abb. 4.2). Das Enzym Wdf1 führte keine Kondensation der Intermediate mit einem Beender durch, bildete also keine Diarylheptanoide.

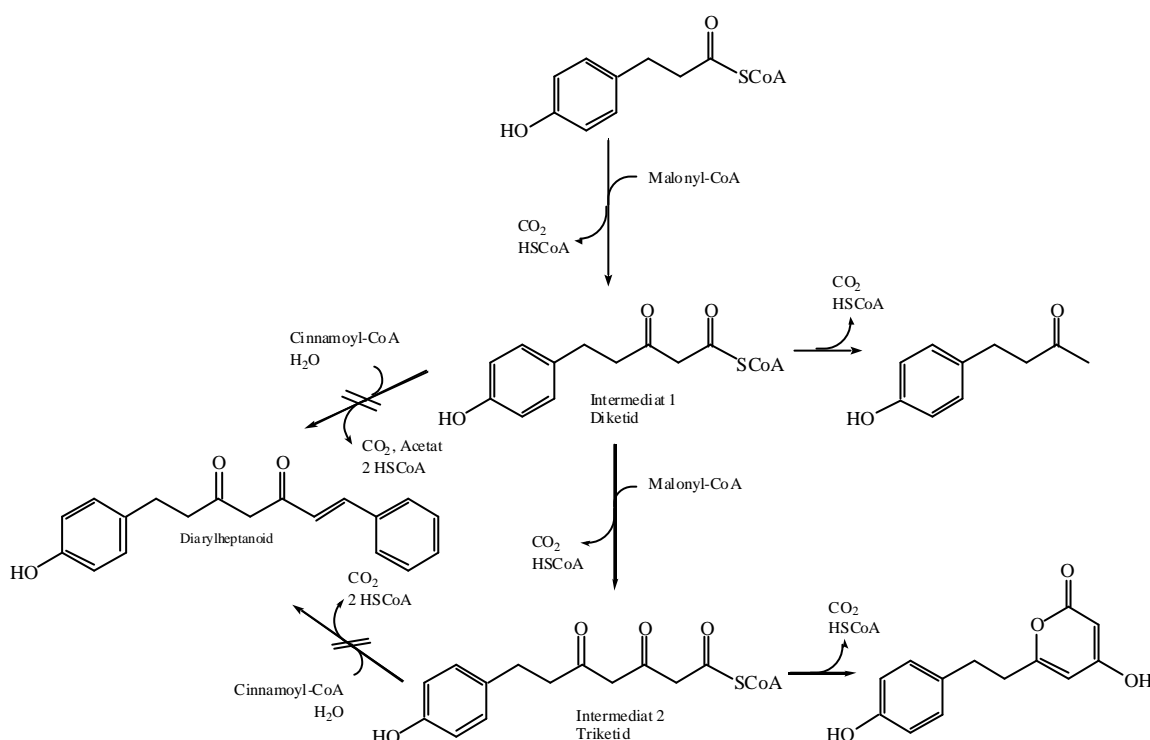


Abb. 4.2: Die Reaktionen des Enzyms Wdf1 am Beispiel von Dihydro-*p*-cumaroyl-CoA als Starter und Cinnamoyl-CoA als Beender. Es wurden 2-Ketone und Pyrone gebildet, jedoch keine Diarylheptanoide.

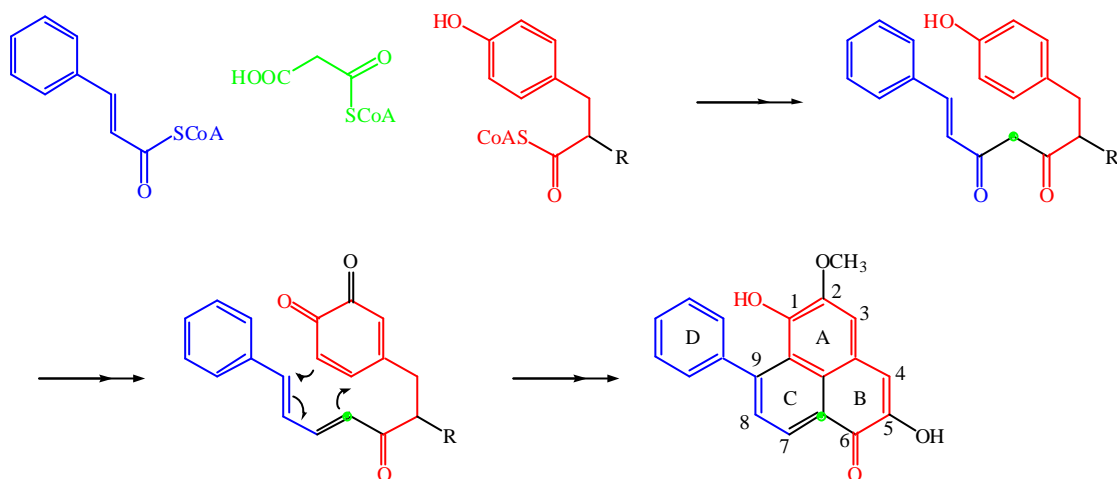
Das Enzym Wdf1 führt also wahrscheinlich den ersten Kondensationsschritt in der Biosynthese der Diarylheptanoide durch. Allerdings wird noch ein weiteres Enzym für die Kondensation eines Intermediates mit dem Beender benötigt. Ob das natürliche Produkt von Wdf1, d.h. der Starter für das zweite Enzym, das Intermediat nach einer oder zwei Kondensationen ist, kann nicht eindeutig entschieden werden. Beide Intermediate kommen als Substrat für den zweiten Kondensationsschritt infrage. Die Ergebnisse der Enzymassays mit Wdf1 zeigten jedoch klar, dass überwiegend Pyrone erhalten wurden. 2-Ketone wurden zwar bei den suboptimalen Starter-Substraten wie *p*-Cumaroyl-CoA z.T. sogar als Hauptprodukte gebildet, traten jedoch bei Verwendung von 2,3-gesättigten Starter-Substraten (z.B. Dihydrocinnamoyl-CoA) nicht auf. Es erscheint außerdem bemerkenswert, dass der Einsatz von Diketid-Substraten im Enzymassay mit Wdf1 ebenfalls zu Intermediaten 2 (Abb. 4.2),

also den Triketiden führt. Weitere Kondensationsschritte mit Malonyl-CoA werden von Wdf1 nicht katalysiert. Nach diesen Ergebnissen kann Wdf1 als Triketidsynthase bezeichnet werden. Daraus zwingend dem Triketid (Intermediat 2) in Abb. 4.2 die Rolle des Substrates für ein zweites Enzym für die Kondensation mit dem Beender zuzuschreiben, wäre nicht berechtigt. Eine solche Funktion kann aber auch nicht ausgeschlossen werden.

Die in *Wachendorfia thyrsiflora* gefundenen zyklischen Diarylheptanoide (Phenylphenalenone) verlangen die Synthese eines unsymmetrischen linearen Diarylheptanoids mit unterschiedlichen Substitutionsmustern der Phenylringe und Sättigungsgraden der Phenylpropanoid-Elemente als Vorstufe. Damit stellt sich die Frage, von welcher Seite des Diarylheptanoids die Biosynthese beginnt, also ob Wdf1 dasjenige Phenylpropanoid (in Abb. 4.3 blau) als Starter benutzt, dessen Phenylring letztlich Ring D in Phenylphenalenonen bildet oder dasjenige (in Abb. 4.3 rot), dessen Phenylring am Ende Ring A bildet. Abb. 4.3 zeigt ein Schema der Synthese eines in *Wachendorfia thyrsiflora* vorkommenden Phenylphenalenons, des Haemodorin.

Folgende Punkte sind zu beachten, wenn dieses Problem untersucht werden soll:

1. Der Phenylring im linken Teil (blau) des Phenylphenalenons trägt in der Regel keine Hydroxylfunktion (Ausnahme: Abb. 1.2 M).
2. Zur Durchführung der 4+2-Zykloaddition (Diels-Alder-Reaktion) ist ein Dien im linken (blauen) Teil unbedingt nötig.
3. Der Ring A, der aus dem „roten“ Phenylpropanoid gebildet wird, ist bei *Wachendorfia thyrsiflora* immer durch eine *p*- und eine *m*-Sauerstofffunktion modifiziert (Abb. 1.2). Diese Substitutionen werden für die Bildung eines Dienophils mit *o*-Chinon-Struktur benötigt.
4. Eine Doppelbindung im rechten Teil (rot) ist nicht notwendig. Zwei  $sp^3$ -hybridisierte C-Atome in Position 4 und 5, also eine Einfachbindung in diesem Teil des Diarylheptanoids, begünstigen Konformationen, die Dien und Dienophil in *exo*-Position zueinander bringen und erleichtern so die Zykloaddition.
5. An Position 5 gibt es sehr häufig eine Sauerstofffunktion.



R: H oder OH

Abb. 4.3: Schema der Biosynthese von Haemodorin. Es wurden nur einige mögliche Intermediate dargestellt. Bei der Bezeichnung der C-Atome wurde von der Nummerierung von Anigorufon (Abb. 1.6) ausgegangen. (R: Abhängig davon, wann die Hydroxylfunktion an C5 eingeführt wird, kann sich an dieser Stelle in den verschiedenen Biosyntheseintermediaten eine Hydroxylgruppe befinden.)

Bei der Betrachtung der Doppelbindungsproblematik (Punkte 2 und 4) fällt auf, dass Wdf1 ungesättigte Phenylpropanoyl-CoA-Ester deutlich besser als solche mit Doppelbindung umsetzt. Dies spricht dafür, dass zuerst der rechte Teil (rot) gebildet wird. Weiterhin ist Wdf1 in der Lage, hydroxylierte Phenylpropanoyl-CoAs, wenn auch schlechter, umzusetzen (Punkt 1 und 3). Auch dies ist ein Hinweis dafür, dass von Wdf 1 der rechte (rote) Teil gebildet wird, da sonst häufiger Phenylphenalenone mit OH-Gruppe im Ring D gefunden werden müssten. Der Umsatz von Dihydrocaffeoyl-CoA durch das Enzym ist sehr klein, sodass die *m*-Hydroxygruppe des Ring A (an C-2 in Haemodorin) möglicherweise erst nach der Synthese des Diarylheptanoids z.B. durch P-450 abhängige Hydroxylierung eingeführt wird.

Ein sehr wichtiges Ergebnis ist die Akzeptanz von Phenylpyruvatoyl-CoA durch Wdf1. Dieses Ergebnis wurde bisher von keiner anderen Polyketidsynthase beschrieben. Bei diesem Enzym macht die Akzeptanz dieses Moleküls jedoch Sinn, da für die Phenylphenalenone von *Wachendorfia thyrsiflora* das Vorhandensein einer Hydroxylgruppe in Position 5 (Punkt 5) sehr typisch ist. Es stellt sich nämlich die Frage, wann diese Sauerstofffunktion eingeführt wird. Da das Enzym Wdf1 in der Lage ist, Phenylpyruvatoyl-CoA umzusetzen, könnte diese Position schon bei der Bildung des Diarylheptanoids hydroxyliert sein. In diesem Fall würde Wdf1 Phenylpyruvatoyl-CoA nicht nur im Enzymassay sondern auch unter Zellbedingungen als Starter akzeptieren. Bei Einbau von Phenylpyruvatoyl-CoA im rechten Teil (rot) würde die  $\alpha$ -Ketogruppe von Phenylpyruvatoyl-CoA die oft vorhandene C-5-Hydroxygruppe des Phenylphenalenons bilden (Abb. 4.4). Ein Einbau im linken Teil ergibt dagegen keinen Sinn. Phenylpyruvat ist zwar bei Pflanzen, im Gegensatz zu den Bakterien kein Intermediat der Phenylalaninbiosynthese, es kann jedoch aus Phenylalanin durch Transaminierung gebildet

werden und wurde in Pflanzen nachgewiesen <sup>[126]</sup>. *p*-Hydroxyphenylpyruvat bzw. *p*-Hydroxyphenyllactat, welche für die Biosynthese von Phenylpropanoiden mit Hydroxygruppe in Position 5 ebenfalls als Substrate in Frage kommen, können ebenfalls durch Pflanzen synthetisiert werden <sup>[127]</sup>.

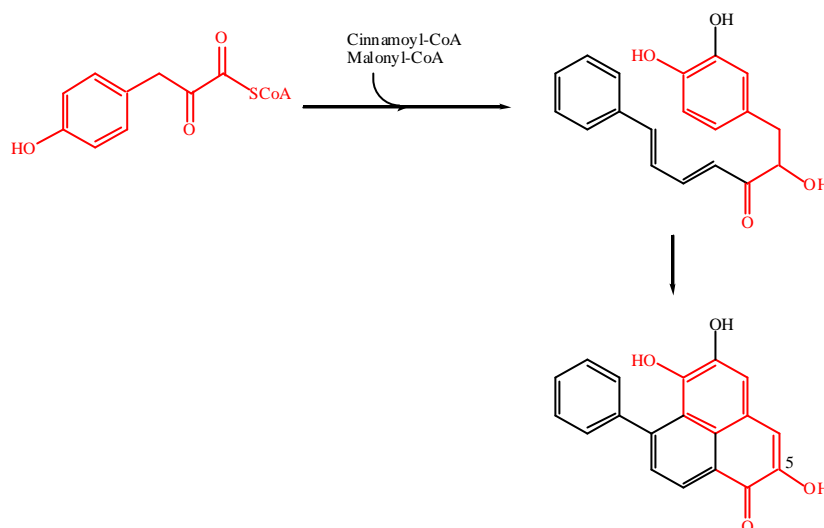


Abb. 4.4: Hypothetische Bildung von Phenylphenalenonen mit zusätzlicher Sauerstofffunktion in Position 5 durch Einbau von *p*-Hydroxyphenylpyruvatoyl-CoA (rot).

Zusammenfassend muss gesagt werden, dass es eine relativ hohe Wahrscheinlichkeit für die Beteiligung von Wdf1 an der Biosynthese der Diarylheptanoide und damit der Phenylphenalene gibt. Man muss aufgrund der vorangegangenen Erläuterungen davon ausgehen, dass Wdf1 dasjenige Phenylpropanoid als Starter verwendet, dessen Phenylring den Ring A der Phenylphenalene bildet (= roter, rechter Teil in Abb. 4.3). Damit wären gesättigte Starter mit und ohne Hydroxylgruppe im Ring die wahrscheinlichen natürlichen Substrate dieses Enzyms. Die zweite Kondensation kann Wdf1 nicht durchführen. Daher scheint ein zweites Enzym zur Kondensation des Intermediats mit einem Beender nötig zu sein. Cinnamoyl-CoA ist aufgrund der Notwendigkeit einer Doppelbindung und des Fehlens einer Hydroxylfunktion der wahrscheinlichste Beender. Auf die Enzyme, mit denen ein solches zweites Enzym verwandt sein könnte, wird in Abschnitt 4.3 eingegangen.

Nicht vollkommen auszuschließen ist jedoch die Möglichkeit, dass ein anderes Enzym, das nicht mit Polyketidsynthasen verwandt ist, die Diarylheptanoidbiosynthese und damit den ersten Schritt der Phenylphenalenonbiosynthese durchführt.

### 4.2.3 Das Enzym Wdf2

Wie bereits in 3.3.3 beschrieben, war das Protein Wdf2 mit allen getesteten Startern unter Variation der verschiedensten Bedingungen inaktiv. Allerdings wurde die mRNA dieses Enzyms in Wurzelkulturen, die mit dem Elicitor Coronalon behandelt wurden, deutlich häufiger gefunden als in nichtbehandelten Kulturen

Phytochemisch führt die Gabe von Elicitoren (Jasmonat, Coronalon) zu einem deutlichen Anstieg (z.B. 8.5 x bei Coronalon) von Methoxyanigorufon, es wird außerdem mehr Anigorufon gebildet <sup>[11,25]</sup>. Man könnte deshalb vermuten, dass Phenylphenalenone ohne Sauerstoff in den Positionen 5 und 6 im Ring B (Nummerierung wie in Abb. 4.3) nach Elicitierung verstärkt gebildet werden, während konstitutiv Phenylphenalenone mit Sauerstofffunktion in Position 6 in *Wachendorfia thyrsiflora* vorherrschen (siehe Abb. 1.2). Der Modus der Umschaltung auf die verstärkte Bildung von (Methoxy-)anigorufon ist bis jetzt unbekannt. Er sollte jedoch in der Art der Regulation der an der Biosynthese beteiligten Enzyme liegen. Möglicherweise werden unterschiedliche Oxidoreduktasen aktiviert. Jedoch kann die Eliminierung der Sauerstofffunktion an C-6 erst nach der Kondensation zum Diarylheptanoid erfolgen, da sie aus der Säurefunktion eines der beiden Phenylpropanoide stammt. Die Induktion von Wdf2 kann daher nicht für die Änderung des phytochemischen Profils von induzierten *Wachendorfia thyrsiflora*-Wurzelkulturen verantwortlich sein.

Das Enzym Wdf2 zeigte auch dann keine Aktivität, wenn es mit den Diketid-NAC-Estern als Intermediat und dem CoA-Ester eines Phenylpropanoids als Beender oder zusammen mit Wdf1 inkubiert wurde. Es ist also vermutlich auch nicht das Enzym, welches den zweiten Kondensationsschritt der Diarylheptanoidbiosynthese durchführt. Diese Möglichkeit lässt sich jedoch nicht völlig ausschließen, besonders wenn man berücksichtigt, dass über einige Intermediate der Diarylheptanoid-Biosynthese noch keine völlige Klarheit herrscht.

Eine weitere mögliche Funktion ist eine frühere Aktivität als Chalconsynthase, die jedoch im Laufe der Evolution durch Mutation verloren ging. Für diese Annahme spricht, dass auch nach der Induktion mit Coronalon keine Flavonoide oder Stilbene in den Wurzelkulturen gefunden wurden, obwohl bekannt ist, dass gerade diese Stoffe induziert werden sollten <sup>[25]</sup>.

Das vollkommene Fehlen einer Chalconsynthase wäre eher ungewöhnlich. Bei allen anderen Pflanzen außer Rhabarber (*Rheum palmatum*), die eine ungewöhnliche Polyketidsynthese haben, existiert auch eine funktionsfähige Chalcon- oder Stilbensynthase. Bei Rhabarber wurde neben der Aloesonsynthase auch eine Benzalacetonsynthase gefunden. Benzalacetonsynthase führt lediglich eine Kondensation aus. Es könnte sich also bei der Benzalacetonsynthase um eine frühere Chalconsynthase handeln, die die Fähigkeit zu drei Kondensationen durch Mutation verloren hat. Möglicherweise hat die frühere

Chalconsynthese von *Wachendorfia thyrsiflora* die Fähigkeit zu Kondensationen mit Malonyl-CoA ganz verloren und wird jetzt zwar noch als Reaktion auf einen Elicitor als Wdf2 induziert, zeigt aber keine Aktivität mehr.

#### 4.2.4 Das Enzym Wdf3

Die mRNA von Wdf3 wurde ebenfalls nach Induktion der Wurzelkultur von *Wachendorfia thyrsiflora* mit Coronalon gefunden, aber nur in sehr geringen Mengen relativ zu den mRNAs von Wdf1 und 2. Das Protein Wdf3 verwendet als Starter ausschließlich aliphatische CoA-Ester. Eine Umsetzung von aromatischen Strukturen konnte nicht nachgewiesen werden. Bei der Umsetzung von *n*-Hexanoyl-CoA wurden zwei Produkte nachgewiesen. Eines konnte eindeutig als 4-Hydroxy-6-pentyl-2*H*-pyran-2-on bestimmt werden, da es den gleichen R-Wert wie das entsprechende Enzymprodukt von Wdf1 hat. Dieses Pyron ist das Produkt der Reaktion von einem Molekül *n*-Hexanoyl-CoA mit zwei Molekülen Malonyl-CoA. Bei dem zweiten Produkt handelte es sich vermutlich um 2-Heptanon, also dem Produkt aus je einem Molekül *n*-Hexanoyl-CoA und Malonyl-CoA (Abb. 4.5).

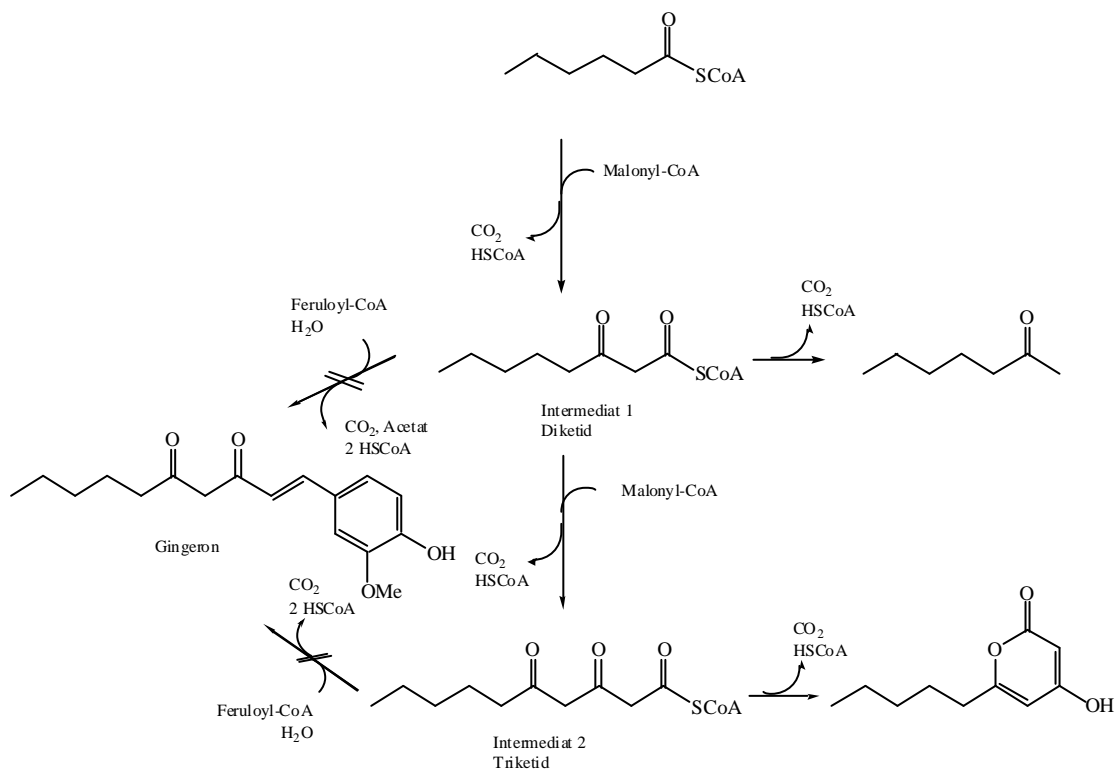


Abb. 4.5 Die Reaktionen des Enzyms Wdf3 am Beispiel von *n*-Hexanoyl-CoA als Starter und Feruloyl-CoA als Beender in der Übersicht. Es werden 2-Ketone und Pyrone gebildet, jedoch keine Gingerone.

Von Wdf3 wurden also, wie auch von Wdf1, maximal zwei Kondensationen durchgeführt. Dieses Enzym kann also ebenfalls nicht an der Biosynthese von Diarylheptanoiden beteiligt

sein. Möglicherweise ist es jedoch das erste Enzym bei der Synthese von Substanzen, die sich aus Gingeronen ableiten. Einige dieser Strukturen wurden in Abb. 4.6 dargestellt. Der wichtigste Vertreter ist sicherlich das [6]-Gingerol, vom dem anti-oxidative und entzündungshemmende Wirkungen beschrieben wurden <sup>[128,129]</sup>. Es wird vermutet, dass diese Substanzen aus einem aromatischen Phenylpropanoid, einem Acetatrest und, statt dem zweiten Phenylpropanoid wie bei Diarylheptanoiden, einem aliphatischen Säure-CoA synthetisiert werden <sup>[130]</sup>. Gingeronderivate wurden bisher nicht in *Wachendorfia thyrsiflora* gefunden. Da die Phytochemie induzierter *Wachendorfia thyrsiflora*-Kulturen bisher nicht systematisch im Hinblick auf Gingerone und davon abgeleitete Verbindungen untersucht wurde, könnte die Konzentration dieser Verbindungen unter der Nachweisgrenze liegen. Der Grund für die geringen Konzentrationen könnte in den geringen Mengen von Wdf3-mRNA liegen.

Wie bei den Diarylheptanoiden wird auch bei den Gingeronen noch ein weiteres Enzym für den zweiten Kondensationsschritt benötigt, da Wdf3 diese zweite Kondensation mit einem Phenylpropanoid nicht durchführen kann. Dies könnten für Gingerone und Diarylheptanoide dasselbe oder zwei verschiedene Enzyme mit sehr ähnlicher Funktion sein.

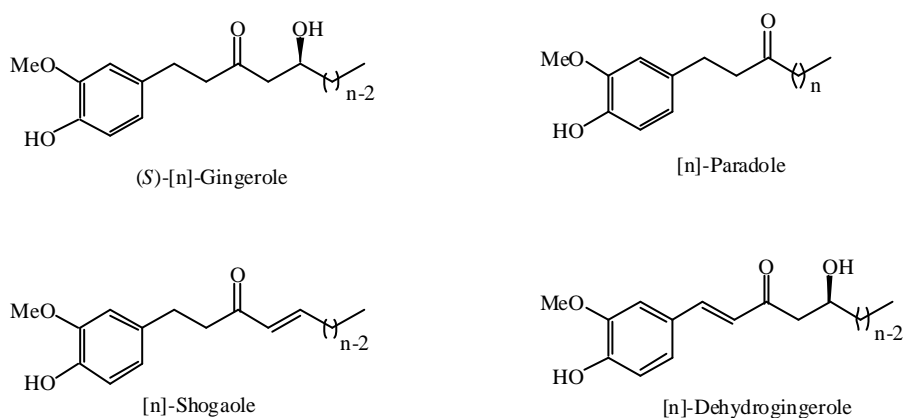


Abb. 4.6: Beispiele für Naturstoffe, die sich aus Gingeronen herleiten <sup>[131]</sup>.  $n$ : 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12.



### 4.3 Das Enzym für den zweiten Kondensationsschritt

Wie bereits beschrieben, katalysiert das Enzym Wdf1 aus *Wachendorfia thyrsiflora* die Biosynthese von Di- und Triketiden, die wahrscheinlich den ersten Kondensationsschritt der Diarylheptanoidbiosynthese darstellt (4.2.2). Dieses Enzym ist jedoch nicht in der Lage, die zweite Kondensation des Intermediates mit einem Beender durchzuführen. Es wird also ein weiteres Enzym benötigt, das dann als eigentliche Diarylheptanoidsynthase zu bezeichnen wäre. Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit den Voraussetzungen, über die dieses zweite Enzym verfügen muss, einer Diskussion über mögliche verwandte Enzyme und den Fragen, wie dieses Enzym gefunden werden könnte und welche Substrate es benötigt.

Das Enzym für die Diarylheptanoidbiosynthese muss in der Lage sein, ein aus dem Starter-Phenylpropanoid und Malonyl-CoA von Wdf1 gebildetes Intermediat (Intermediat 1 oder 2 in Abb. 4.1) mit einem weiteren Phenylpropanoid, dem Beender, zu kondensieren.

Chemisch gesehen ist diese Reaktion ähnlich wie bei Typ III-Polyketidsynthasen, eine Claisen-Kondensation. Jedoch stellt die Umsetzung eines relativ voluminösen Phenylpropanoyl-CoA-Esters mit dem Di- oder Triketidintermediat andere sterische Anforderungen an ein Enzym als die Reaktion mit Malonyl-CoA. Es wird wesentlich mehr Raum im aktiven Zentrum des Enzyms benötigt. In Kapitel 4.4 wird dargelegt werden, dass keines der aktiven Zentren der gefundenen PKS aus *Wachendorfia thyrsiflora* mehr Raum bietet als andere Typ III-Polyketidsynthasen, welche fast ausnahmslos Malonyl-CoA als Kettenverlängerer benutzen (Ausnahme: *Pinus strobus* CHS2 <sup>[125]</sup>, dort wird Methylmalonyl-CoA benutzt). Da außer Wdf1, Wdf2 und Wdf3 keine weiteren Typ III-Polyketidsynthasen in *Wachendorfia thyrsiflora* gefunden wurden, muss das gesuchte Enzym sehr wahrscheinlich zu einer anderen Enzymfamilie gehören.

Die Rosmarinsäuresynthase <sup>[132,133]</sup> ist ein Beispiel für ein Enzym, das in der Lage ist, zwei Phenylpropanoide zu koppeln. Dieses Enzym (EC 2.3.1.140, Abb. 4.7 A) katalysiert die Veresterung von zwei Phenylpropanoiden: D-4-Hydroxy-phenyllactat und *p*-Cumaroyl-CoA. Die Acidität des 1,3-Diketons des aktivierten Intermediats (Diketid-CoA oder Triketid-CoA, Abb. 4.2), gebildet von Wdf1, könnte einen nukleophilen Angriff auf die aktivierte Carbonylfunktion des zweiten Phenylpropanoids ermöglichen (Abb. 4.7 B). Die Gemeinsamkeit dieser Enzyme ist die Nutzung von jeweils zwei Phenylpropanoiden als Substrate. Unterschiede bestehen im Reaktionsmechanismus (Claisen-Kondensation gegenüber Veresterung).

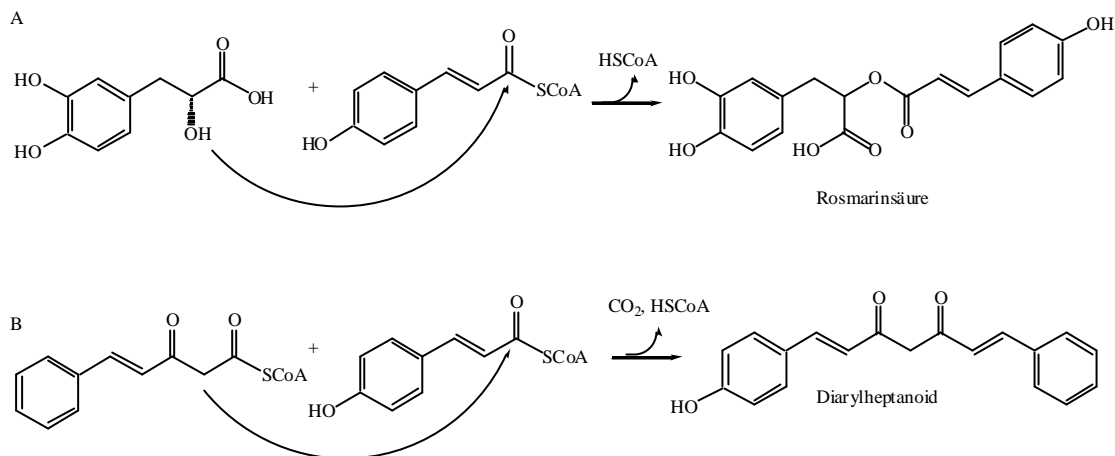


Abb. 4.7: Vergleich der Reaktion, die von Rosmarinsäuresynthase katalysiert wird (A) mit der Reaktion einer hypothetischen Diarylheptanoidsynthase (B).

Im Gegensatz zur Rosmarinsäurebiosynthese muss bei der Diarylheptanoidbiosynthese noch eine Decarboxylierung erfolgen. Dies könnte durch die Diarylheptanoidsynthase selbst geschehen. Ein Beispiel dafür sind die Stilbensynthasen. Sie führen neben den Zyklisierungen auch Decarboxylierungen durch.

In ähnlicher Weise sollte die Reaktion einer „Gingeronsynthase“ mit dem Intermediat, welches von Wdf3 gebildet wird, und einem Phenylpropanoid als Beender ablaufen. Dabei könnte es sich bei der Diarylheptanoidsynthase und der „Gingeronsynthase“ auch um das selbe Enzym handeln. Interessanterweise gibt es durchaus Pflanzen in denen sowohl Rosmarinsäure als auch Gingeronderivate gemeinsam vorkommen und die demnach sowohl Rosmarinsäuresynthase<sup>[133]</sup> als auch „Gingeronsynthasen“ enthalten sollten. Dies ist z.B. in der Familie der Labiatae der Fall. Die Vertreter dieser Familie wie z.B. *Plectranthus*-Arten enthalten nicht nur Rosmarinsäure (U. Krause und B. Schneider, unveröffentlicht) sondern auch Albidone, die langkettigen Gingeron-Derivaten entsprechen<sup>[131]</sup>. Die Suche nach einer mit der Rosmarinsäuresynthase verwandten Gensequenz in *Wachendorfia thyrsiflora* und anderen Haemodoraceae wäre also sehr interessant. Leider ist die Gensequenz der Rosmarinsäuresynthase nicht bekannt.

Ein weiteres kondensierendes Enzym, die 5-Aminolävulinatsynthase (EC 2.3.1.37), führt ebenso wie eine hypothetische Diarylheptanoidsynthase eine Claisen-Kondensation aus (Abb. 4.8). Dieses Enzym wurde hauptsächlich in Tieren und Bakterien beschrieben, wo es die Synthese von 5-Aminolävulinat, den ersten Schritt der Hämbiosynthese, katalysiert. Obwohl in Pflanzen 5-Aminolävulinat als Chlorophyll-Vorstufe normalerweise aus Glutamat synthetisiert wird, wurde 5-Aminolävulinatsynthase auch zweimal in Pflanzen nachgewiesen: in der Kartoffel (*Solanum tuberosum*<sup>[134]</sup>) und in Spinat (*Spinacia oleracea*<sup>[135]</sup>). Beide

Enzyme wurden schon vor längerer Zeit beschrieben. Bis heute sind jedoch die Gensequenzen dieser Proteine nicht bekannt. Die 5-Aminolävulinsynthase ist jedoch nicht in der Lage, Phenylpropanoide umzusetzen. Ihre natürlichen Substrate sind mit Malonyl-CoA und Glycin eher kleine Moleküle. Sollte sich die Diarylheptanoidsynthase aus diesem Enzym entwickelt haben, wären dafür sehr große Änderungen der Proteinstruktur notwendig gewesen, so dass eine Ähnlichkeit heute möglicherweise nicht mehr festzustellen wäre.

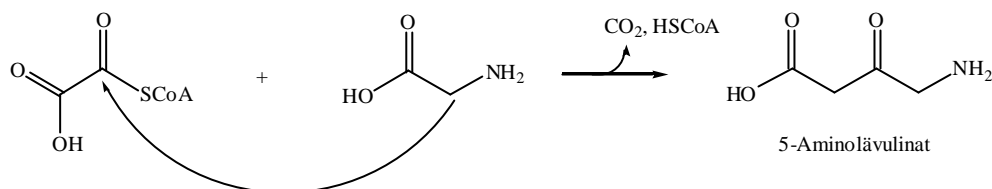


Abb. 4.8: Biosynthese von 5-Aminolävulinat durch das Enzym 5-Aminolävulinsynthase.

Wegen der unbekannten Sequenzen von Rosmarinsäuresynthase und 5-Aminolävulinsynthase und damit fehlender Verwandtschaftsinformationen ergeben sich Probleme bei der molekularbiologischen Untersuchung des Enzyms für den zweiten Kondensationschritt der Diarylheptanoid- oder Gingeronbiosynthese. Für die Charakterisierung dieses Enzyms macht sich daher ein biochemischer Ansatz erforderlich, der auch den Vorteil hat, breiter angelegt zu sein, d.h. auch andere Enzyme der gesuchten Funktion zu erfassen. Dazu ist die Isolierung aus der Pflanze notwendig. Mögliche Lösungsansätze werden im Abschnitt 4.5 diskutiert.

#### 4.4 Untersuchungen zur Struktur der Polyketidsynthasen aus *Wachendorfia thyrsiflora*

In diesem Kapitel sollen die strukturellen Unterschiede zwischen verschiedenen pflanzlichen Typ III-Polyketidsynthasen (Chalconsynthase, 2-Pyronsynthase und den *Wachendorfia*-PKS) diskutiert werden, um, falls möglich, einen Zusammenhang zwischen der Struktur und der Funktion dieser Enzyme abzuleiten.

Röntgenkristallstrukturanalysen wurden insbesondere von der Chalconsynthase von *Medicago sativa* veröffentlicht <sup>[71]</sup>. Dieses Enzym und einige Mutanten wurden mit verschiedenen Liganden kokristallisiert. 2-Pyronsynthase ist jedoch diejenige Polyketidsynthase, die den *Wachendorfia*-Enzymen am ähnlichsten und von der eine Kristallstruktur bekannt ist. Zum Vergleich mit den in *Wachendorfia thyrsiflora* gefundenen Enzymen wurden daher die Chalconsynthase aus *Medicago sativa* und die 2-Pyronsynthase aus *Gerbera hybrida* herangezogen

Zunächst erfolgte eine Modellierung der drei *Wachendorfia*-Enzyme mit dem Computerprogramm SWISS-MODEL <sup>[136-138]</sup>. Im ersten Schritt vergleicht dieses Programm die Primärsequenz des Proteins, dessen Modell erstellt werden soll, mit den Primärsequenzen der Proteine von denen Tertiärstrukturen bekannt sind. Ist ein solches Protein vorhanden, wird die Tertiärstruktur des untersuchten Proteins ähnlich der schon bekannten Struktur aufgebaut. Dabei ist es jedoch möglich, dass aufgrund der Primärsequenz des gesuchten Proteins eine identische Faltung nur zum Teil möglich ist. Bei denjenigen Sequenzen, die nicht zugeordnet werden können, berechnet das Programm eine thermodynamisch mögliche Struktur. Naturgemäß ist die durch das Programm berechnete Struktur umso genauer, je größer die Ähnlichkeit der Sequenz des Proteins mit einer Sequenz bekannter Struktur ist.

Dieses Verfahren wurde auf die drei Polyketidsynthesesequenzen von *Wachendorfia* angewendet. Da die Sequenzähnlichkeit dieser Proteine mit Chalconsynthase und 2-Pyronsynthase relativ hoch ist, wählte SWISS-MODEL erwartungsgemäß die bekannten Strukturen von Typ III-Polyketidsynthasen als Ausgangspunkt für die Modellierung aus. Schaut man sich oberflächlich die Modelle dieser Proteine an (Abb. 4.9), so sind kaum Unterschiede in den Strukturen erkennbar. Alle größeren sekundären Strukturen,  $\beta$ -Faltblätter und  $\alpha$ -Helices, liegen in den berechneten *Wachendorfia*-Modellen an denselben Stellen wie in der Chalconsynthase.

Erst ein genauerer Blick auf die aktiven Zentren ließ Unterschiede in den Strukturen erkennen. Als Raummodelle wurden in Abb. 4.10 diejenigen Aminosäuren dargestellt, die die Bindungstasche für die Substrate bilden. Dazu zählt auch das Cystein 164, denn an dessen SH-Gruppe wird das Substrat gebunden. Vergleicht man die Größe dieser Bindungstasche von 2-Pyronsynthase mit der von Chalconsynthase, so fällt die deutliche Einengung sofort ins Auge. Es ist also nicht verwunderlich, dass 2-Pyronsynthase als Starter-CoA nur Acetyl-CoA akzeptiert, da die vorhandene Bindungstasche nicht groß genug für Phenylpropanoyl-CoA-Ester ist.

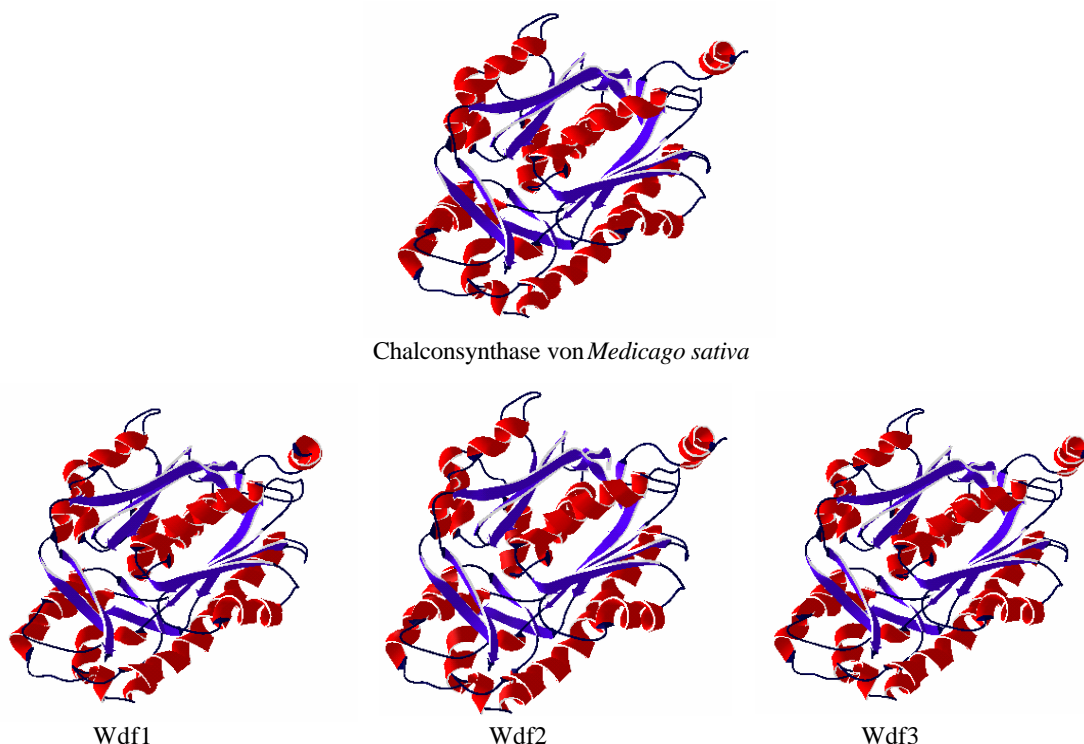


Abb. 4.9: Strukturen der Proteinmonomere Wdf1, Wdf2 und Wdf3 im Vergleich zur Chalconsynthase aus *Medicago sativa* (Luzerne). Die Röntgenkristallstruktur der Chalconsynthase wurde als Grundlage für die Modellierung der *Wachendorfia*-Proteine durch das Programm SWISS-MODEL genutzt. Die Darstellung der Strukturen erfolgte mit dem Programm Swiss-PdbViewer. Helix-Bereiche wurden rot, Faltblattstrukturen blau dargestellt.

Die meisten Aminosäuren im aktiven Zentrum (Gly216, Phe215, Asn336, His303, Cys164, Ile254, Pro375, Phe265, Leu263, Thr194) wurden bei den *Wachendorfia thyriflora*-PKS im Vergleich zu Chalconsynthasen nicht oder nur wenig variiert. Eine Ausnahme bilden die Aminosäuren Thr132 und Ser133, die in Wdf1 durch die aliphatischen Aminosäuren Glycin und Alanin ersetzt wurden. Die Aminosäure 132 gehört zur Zyklisierungstasche (das ist der Raum, in dem bei CHS die Bildung des Chalcones stattfindet), während 133 zur Substratbindungstasche des Starter-CoA (der Raum, in dem der Starter-CoA-Ester gebunden wird) gehört. Inwiefern diese Aminosäurevariationen Einfluss auf die Enzymaktivität und die -spezifität (z.B. durch fehlende Wasserstoffbrückendonatoren) haben, kann jedoch nur durch Mutagenesestudien untersucht werden.

Eine Einengung der Substratbindungstasche bei Wdf1 kommt durch die bereits in Abschnitt 3.5.1 erwähnten Variationen der Aminosäuren Thr197 durch Phenylalanin und Ser338 durch Methionin zustande. Diese Einengung ist aber offensichtlich nicht so groß, dass die Bindung von Phenylpropanoiden verhindert wird, da Wdf1 diese als Starter akzeptiert. Möglicherweise ist sie aber dafür verantwortlich, dass Wdf1 nur zwei statt der bei Chalconsynthasen üblichen drei Kondensationen durchführen kann.

Bei Wdf3 ist Ser338 durch das sehr große Phenylalanin ersetzt. Thr197 wurde durch das kleinere Serin ersetzt, wodurch die Einengung durch das Phenylalanin teilweise wieder rückgängig gemacht wird. Aus dieser Darstellung der aktiven Tasche ist daher nicht zu ersehen, weshalb Wdf3 keine Phenylpropanoide als Starter-CoA umsetzt. Möglicherweise liegt der Grund dafür mehr in peripheren Bereichen des Proteins. Eine solche Möglichkeit der Beteiligung peripherer Aminosäuren wurde vor kurzem auch bei der Acridonsynthese von *Ruta graveolens* diskutiert <sup>[139]</sup>.

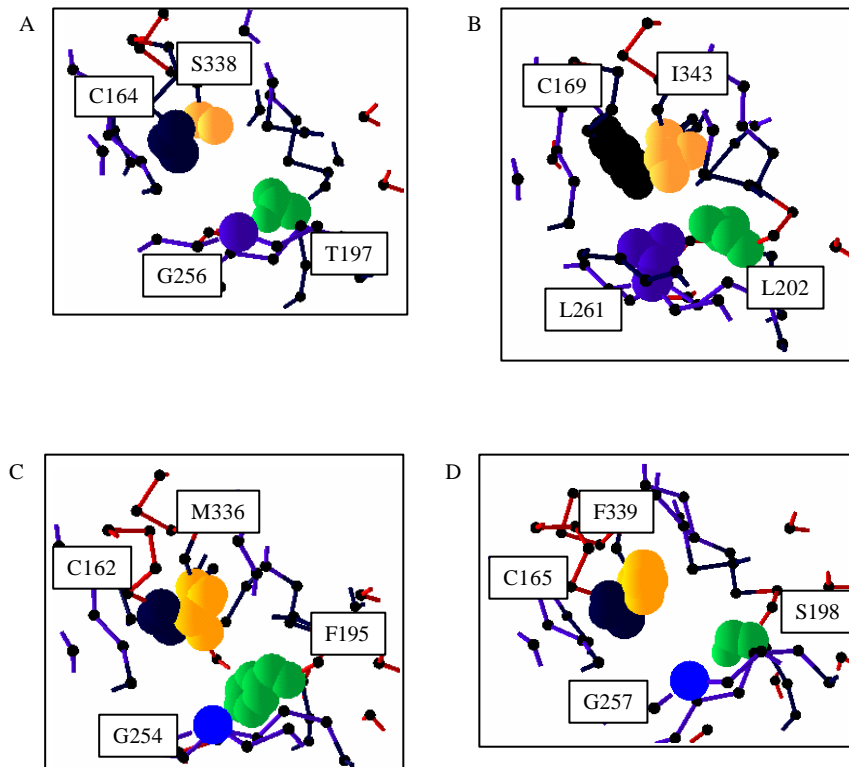


Abb. 4.10: Darstellung der Substratbindungstaschen von A: Chalconsynthase (*Medicago sativa*), B: 2-Pyronsynthase (*Gerbera hybrida*) sowie C: Wdf1 und D: Wdf3. Die bezeichneten Aminosäuren wurden als Raummodell dargestellt. Von weiteren Aminosäuren, die sich in einem Abstand von maximal 7 Å von der Bindungstasche entfernt befinden, wurde das Proteinrückgrat dargestellt (blau: Faltblattstrukturen, rot: Helices).

Das Protein Wdf2 unterscheidet sich im aktiven Zentrum in keiner Weise von Wdf3. Auf eine Darstellung des aktiven Zentrums analog zu Abb. 4.10 wurde deshalb verzichtet. Abb. 4.11 zeigt die Gesamtstruktur von Wdf2. Dabei wurden die Unterschiede zu Wdf3 grün und der Bereich des aktiven Zentrums rot markiert. Deutlich erkennbar ist, dass alle 22 Aminosäurevariationen in peripheren Bereichen auftraten (siehe auch Abschnitt 3.5.2) und das aktive Zentrum nicht betrafen. Trotzdem ließ sich für dieses Enzym keine Aktivität nachweisen.

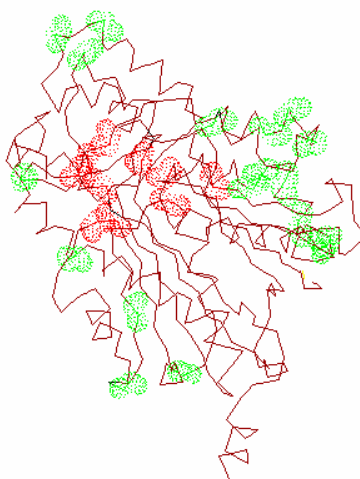


Abb. 4.11: Struktur von Wdf2 (Monomer) mit Markierung der Aminosäuren des aktiven Zentrums (rot) und der Aminosäuren, die sich von den in Wdf3 unterscheiden (grün).

Besonders viele Variationen ergaben sich im Aminosäurebereich 308-327, der zu den  $\alpha$ -Helices 10 und 11 gehörte (Bezeichnung nach Austin <sup>[140]</sup> für CHS). Diese Helices liegen zwischen den für die Aktivität der Proteine wichtigen Bereichen 303-308 und 335-338 mit Aminosäuren des aktiven Zentrums (His303, Asn336) und der Substratbindungstasche (Gly305, Ala308, Ser338). Die meisten dieser Mutationen waren wegen der hohen strukturellen Ähnlichkeit jedoch eher von geringer Bedeutung (Mutation von Valin zu Isoleucin oder Alanin, Glutamin zu Glutamat, Serin zu Threonin). Der Austausch von Arg325 in Wdf3 gegen Threonin in Wdf2 könnte jedoch wichtig sein, da in allen anderen betrachteten PKS (siehe Abb. 3.24) hier eine basische Aminosäure vorliegt. Allerdings wurde für diese Aminosäure bisher keine spezifische Funktion beschrieben. Weiterhin könnten die Mutationen der Stellen 48 und 51 von Bedeutung sein, die nahe an der Bindungsstelle für CoA (Lys55, Arg58 und Lys62 bei CHS) liegen. Der Austausch der Aminosäure 120, welche bei Wdf2 Serin ist, in allen anderen untersuchten Proteinen jedoch Prolin, könnte ebenfalls eine Rolle spielen. Diese Aminosäure liegt in einer Schleife zwischen  $\alpha$ -Helix 5 und  $\beta$ -Faltblatt 4. Die Mutation könnte daher die Faltung des Proteins an dieser Stelle beeinflussen. Bei Wdf2 treten gegenüber Wdf3 nur kleine Abweichungen in der Aminosäuresequenz auf. Bisher wurde jedoch nicht beschrieben, welchen Einfluss diese Aminosäuren auf die Enzymaktivität haben könnten. Diese eher unbedeutenden Variationen müssen also einen größeren Einfluss auf die Proteinaktivität als bisher bekannt haben. Mutageneseuntersuchungen mit diesen Enzymen könnten daher lohnenswert sein, wenn man mehr über den strukturellen Ablauf der Kondensationsreaktionen erfahren möchte.

Wie in diesem Kapitel diskutiert, gibt es nur wenige sichere Schlussfolgerungen für Struktur-Funktionsbeziehungen, die man aus den Strukturuntersuchungen anhand von Modelling-Experimenten ziehen kann. Klarheit können lediglich Röntgenkristallstrukturanalysen und NMR-Untersuchungen in Lösung bringen.

Keine der Polyketidsynthasen von *Wachendorfia thyrsiflora* zeigt Änderungen im aktiven Zentrum, die groß genug wären, um Kondensationsreaktionen von Malonyl-CoA mit Phenylpropanoiden zu verhindern. Trotzdem wurde bei Wdf2 keine Aktivität nachgewiesen und Wdf3 akzeptiert nur aliphatische Starter.

Der Vergleich mit anderen PKS des Typ III ergibt jedoch auch keinen Hinweis auf eine Vergrößerung des aktiven Zentrums, die erforderlich wäre, wenn eines der gefundenen Enzyme den zweiten Kondensationsschritt zum Diarylheptanoid ausführen soll. Nach dem herkömmlichen Modell erfordert dieser Kondensationsschritt, dass das Intermediat (Diketid- oder Triketid-CoA) an die Substratbindungsstelle gebunden wird und der Beender anstelle von Malonyl-CoA als „Verlängerer“ mit dem Intermediat kondensiert. Dies könnte auch umgekehrt der Fall sein, wobei der Beender die Rolle des Starters übernehmen würde und das Intermediat die Rolle des Verlängerers. In beiden Fällen würde sehr viel Platz benötigt, der anscheinend nicht zur Verfügung steht. Diese strukturellen Überlegungen werden durch die experimentellen Befunde unterstützt, dass bei Verwendung zweier verschiedener Phenylpropanoyl-CoAs als Starter ausschließlich Pyrone und 2-Ketone als Produkte erhalten wurden, jedoch keine Diarylheptanoide. Der Einsatz zweier *Wachendorfia*-Polyketidsynthasen (z.B. Wdf1 zusammen mit Wdf2 oder Wdf1 zusammen mit Wdf3) im selben Assay führte ebenfalls nicht zu Diarylheptanoiden. Aufgrund der vorangegangenen Diskussion erscheint es sehr unwahrscheinlich, dass eine der drei in *Wachendorfia thyrsiflora* gefundenen Polyketidsynthasen die Katalyse des zweiten Kondensationsschrittes übernimmt. Die zweite Kondensationsreaktion wird wahrscheinlich durch ein weiteres Enzym, das deutliche strukturelle Unterschiede zu Typ III-Polyketidsynthasen aufweist, durchgeführt. Dieses Problem wurde in Kapitel 4.3 diskutiert.

#### **4.5 Lösungsansätze zur Aufklärung des zweiten Kondensationsschrittes**

In den vorangegangenen Abschnitten wurde diskutiert, dass ein zweites Enzym gebraucht wird, welches das Intermediat aus der ersten Kondensationsreaktion mit einem Beender umsetzt. Die Abschnitte 4.2 und 4.4 zeigten, dass das Enzym Wdf1 vermutlich für die erste Kondensation zum Intermediat verantwortlich ist. In 4.3 wurde diskutiert, welche bekannten pflanzlichen Enzyme mit dem gesuchten Enzym für den zweiten Kondensationsschritt



verwandt sein könnten. Es wurde auch dargestellt, dass als wahrscheinlichster Beender Cinnamoyl-CoA in Betracht kommt.

In diesem Abschnitt sollen nun Lösungsansätze beschrieben werden, die zur Aufklärung der Natur des zweiten Enzyms führen könnten. Da von keinem der diskutierten Enzyme Sequenzinformationen vorliegen, kann eine Aufklärung nicht mit Hilfe der Molekularbiologie erfolgen. Sie muss vielmehr durch konventionelle Reinigung des Proteins aus der Pflanzenkultur erfolgen. Dazu sind folgende Voraussetzungen zu erfüllen:

(1) Ein Rohextrakt mit aktiven Enzymen. Durch den hohen Gehalt an Polyphenolen in Wurzelkulturen von *Wachendorfia thyrsiflora* bestehen Schwierigkeiten einen geeigneten Rohextrakt zu erhalten. Außer dem Einsatz bekannter Polymere wie Poly(vinylpolypyrrolidon) zur Entfernung der Polyphenole könnte auch eine Acetonpräzipitation der Proteine direkt nach dem Aufschluss hilfreich sein.

(2) Ein geeigneter Enzymassay. Bei dieser Reaktion ist eine Reihe von Substraten möglich, was den Aufbau eines geeigneten Assays erschwert. Der Beender ist vermutlich Cinnamoyl-CoA. Als Intermediate kommen die von Wdf1 erzeugten Di- und Triketid-CoAs in Frage. Diese Substanzen sind jedoch synthetisch schlecht zugänglich. Alternativ könnten die bereits für diese Dissertation synthetisierten Diketid-NAC-Derivate eingesetzt werden. Dabei ist der Einsatz von Dihydrocinnamoyl- oder Dihydro-*p*-cumaroyl-Diketid-NAC am vielversprechendsten. Dies ist jedoch nicht möglich, wenn der natürliche Starter dieses Enzyms das Triketid ist. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung eines gekoppelten Enzymassays mit Wdf1. Dabei werden die zellfreien Extrakte oder die angereicherten Fraktionen zusammen mit Wdf1 im Assay eingesetzt. Dadurch können weiterhin [<sup>14</sup>C]Malonyl-CoA und die bereits vorhandenen Phenylpropanoyl-CoA-Ester als Substrate verwendet werden.

(3) Eine gute Proteinreinigungsstrategie. Die Entwicklung einer Affinitätschromatographie, bei der zunächst ein CoA- oder NAC-Derivat am besten von Zimtsäure an eine geeignete Säule kovalent gebunden wird, scheint hierbei am aussichtsreichsten zu sein. Anschließend wird der enzymhaltige Rohextrakt über die Säule gegeben, wobei Enzyme, die Cinnamoyl-CoA als Substrat verwenden, binden sollten. Dies betrifft neben dem gesuchten Enzym auch Wdf1 und einige andere Proteine, die ebenfalls Cinnamoyl-CoA als Substrat oder Produkt verwenden. Durch schrittweise Veränderung z.B. der Salzkonzentration im Puffer können die gebundenen Proteine von der Säule eluiert werden. Die erhaltenen Fraktionen müssen dann im Enzymassay auf die gewünschte Aktivität untersucht werden. Dieses Prinzip könnte eventuell eher zu einem Erfolg führen als konventionelle Ionenaustauschchromatographie, da in nur einem Schritt eine hohe Anreicherung von Cinnamoyl-CoA-bindenden Proteinen erreicht werden kann.

Dieser biochemische Ansatz zur Aufklärung der Diarylheptanoidbiosynthese sollte auch dann Erfolg haben, wenn das Enzym Wdf1 doch nicht an dieser Biosynthese beteiligt ist. Dies wäre dann der Fall, wenn ein Enzym gefunden würde, das beide Kondensationsreaktionen ausführen kann. Der biochemische Weg ist zumeist wesentlich schwieriger zu begehen als der molekularbiologische Ansatz. Die Untersuchung der Biosynthese der Diarylheptanoide ist auch ein Beispiel dafür, dass zur Lösung biologischer Fragestellungen neben der Genetik und der Molekularbiologie auch bewährte Techniken Verwendung finden können und müssen.

## 5. Zusammenfassung

Diarylheptanoide sind pflanzliche Sekundärstoffe, die insbesondere in Asien große Bedeutung erlangt haben. Auf diese Stoffe geht die Wirksamkeit verschiedener Heilpflanzen wie z.B. des Ingwers zurück, die in der traditionellen asiatischen Medizin sehr wichtig sind. Für die Pflanze selbst scheint der Nutzen in der anti-oxidativen Wirkung dieser Stoffe zu liegen. Dadurch könnten diese Stoffe z.B. bei der Abwehr von durch UV-Strahlung induzierten Schäden helfen. Für polyaromatische Diarylheptanoide, sogenannte Phenylphenalene, wurde eine Funktion bei der Abwehr von Krankheitserregern nachgewiesen. Biosynthetische Untersuchungen haben gezeigt, dass Substanzen aus dem Phenylpropanoid-Stoffwechsel und eine Acetat-Einheit in Diarylheptanoide eingebaut werden. Dies geschieht vermutlich in zwei Kondensationsreaktionen. Die Untersuchung der beteiligten Enzyme war Gegenstand der hier vorgelegten Arbeit. Ein wichtiges Ziel war dabei festzustellen, ob die beiden Kondensationsreaktionen durch ein oder zwei Enzyme durchgeführt werden. Die erste Kondensation ist diejenige eines Phenylpropanoids mit Malonyl-CoA. Solche Reaktionen sind von der Familie der Polyketidsynthasen des Typ III bekannt. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag daher auf der Analyse der in Diarylheptanoide produzierenden Pflanzen exprimierten Polyketidsynthasen.

Als Objekt der Untersuchungen wurde *Wachendorfia thyrsiflora* aus der Familie der Haemodoraceae ausgewählt. Lineare Diarylheptanoide waren in dieser Pflanze nicht bekannt, aber eine zyklische Untergruppe der Diarylheptanoide, die Phenylphenalene. Diese Verbindungen wurden als Gegenstand der Untersuchung gewählt, weil in der Perspektive auch die weiteren an der Biosynthese dieser Naturstoffe beteiligten Enzyme von Interesse sind. Außerdem wurden in der Arbeitsgruppe schon vielfältige phytochemische und biosynthetische Untersuchungen an Haemodoraceae vorgenommen. Dabei wurde auch nachgewiesen, dass in der Biosynthese der Phenylphenalene lineare Diarylheptanoide als Intermediate auftreten. Innerhalb dieser Arbeit wurde eine Reihe von Untersuchungen zu dem am besten geeigneten Pflanzenmaterial durchgeführt. Die Wahl fiel auf Wurzelkulturen von *Wachendorfia thyrsiflora*, weil wegen fehlender Chalcone und Stilbene die Wahrscheinlichkeit, Chalcon- und Stilbensynthasen zu finden, gering war und die Wahrscheinlichkeit für das Auffinden von Diarylheptanoid-Synthasen daher entsprechend größer war. Ein weiterer Grund war die problemlose Extraktion von RNA in guter Qualität, was die molekularbiologischen Untersuchungen sehr erleichterte.

Um die beteiligten Enzyme genauer untersuchen zu können, wurde eine Reihe von möglichen Substraten, Produkten und Vergleichssubstanzen synthetisiert. Dazu zählten (1) CoA-Ester als

Startermoleküle, (2) N-Acetylcysteamin-Derivate der Diketide als biosynthetisch aktivierte Intermediate der Biosynthese nach der ersten Kondensation und (3) Diarylheptanoide als mögliche Produkte der Biosynthese.

Zur Untersuchung der Typ III-Polyketidsynthasen konnte auf eine große Zahl bereits bekannter Sequenzen der Enzymfamilie zurückgegriffen werden. Daher wurden molekularbiologische Methoden zur Untersuchung gewählt. Es wurden zwei Methoden verwendet: (1) 5'/3'-RACE und (2) die Untersuchung einer cDNA-Bank. Mit Hilfe dieser beiden Methoden war es möglich, alle von *Wachendorfia thyrsiflora* transkribierten Typ III-Polyketidsynthasen zu erfassen. Die gefundenen Sequenzen wurden in ein Expressionsplasmid kloniert und anschließend in *E. coli* BL21 DE3 (RIL) exprimiert. Die Reinigung der Enzyme erfolgte durch Metallchelataffinitäts- und Gelfiltrationschromatographie.

*Wachendorfia thyrsiflora* exprimiert die mRNA-Sequenzen von drei Proteinen, die mit Chalconsynthasen einen Identitätsgrad von etwa 60 % aufwiesen. Zwei dieser drei Enzyme (Wdf2 und Wdf3) zeigten untereinander einen hohen Identitätsgrad von 95 %.

Das Enzym Wdf1 wurde in nicht-induzierten Wurzelkulturen von *Wachendorfia thyrsiflora* gefunden. Wdf1 hat sein pH-Optimum bei 6.8- 6.9 in HEPES-Puffer (0.1 M) und ein Temperaturoptimum von 37°C. Dihydrocinnamoyl-CoA erwies sich das beste aromatische Substrat für dieses Enzym. Es akzeptiert jedoch einen weiten Bereich von Substraten angefangen von *n*-Hexanoyl-CoA bis zu Dihydroferuloyl-CoA. Eine Besonderheit ist die Akzeptanz von Phenylpyruvatoyl-CoA, die bisher von keiner Polyketidsynthase beschrieben wurde. Bei *Wachendorfia thyrsiflora* wird erwartet, dass der Einbau dieser Verbindung zu den in dieser Pflanze sehr häufigen an C-5 hydroxylierten Phenylphenalenonen führt. Es könnte sich daher um ein natürliches und für Chalconsynthasen eher ungewöhnliches Starter-Substrat handeln. Die Strukturen der Enzymprodukte wurden durch NMR-spektroskopische und massenspektrometrische Untersuchungen aufgeklärt. Es handelt sich um 2-Ketone und Pyrone. Diese werden nach einer bzw. zwei Kondensationen von Malonyl-CoA mit dem Starter-CoA gebildet. In dieser Dissertation wurden weiterhin enzymkinetische Untersuchungen zur Bestimmung von  $K_m$ - und  $k_{kat}$ -Werten durchgeführt.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Wdf1 den ersten Kondensationsschritt in der Diarylheptanoid-Biosynthese durchführt. Da die in der Biosynthese der Phenylphenalene auftretenden Diarylheptanoide asymmetrisch sein müssen, wurde untersucht, welcher Teil der Phenylphenalene durch dieses Enzym aufgebaut wird. Die Bevorzugung von Dihydroverbindungen, die Akzeptanz von (Dihydro)-*p*-cumarsäure und nicht zuletzt der Einbau von Phenylpyruvatoyl-CoA lassen darauf schließen, dass der Phenylring des von

Wdf1 verwendeten Starter-CoA-Esters nach Abschluss der Biosynthese den Ring A des Phenylphenalenons bildet (vergleiche Abb. 4.3).

Das Enzym Wdf2 wurde überwiegend in einer mit Coronalon induzierten Wurzelkultur gefunden. In dieser Wurzelkultur betrug der Anteil der mRNA von Wdf2 80 % der gefundenen Polyketidsynthase-Sequenzen. Im Enzymassay war keine Enzymaktivität nachweisbar. Aus diesem Ergebnis und dem Fehlen von Flavonoiden wurde die Vermutung abgeleitet, dass Wdf2 früher die Funktion der Chalconsynthase gehabt haben könnte, diese Aktivität jedoch in der Evolution verloren ging.

Hinweise auf eine dritte Polyketidsynthase gab es ebenfalls bei der Untersuchung der RNA von induzierten Kulturen. Eine speziell für die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen angelegte cDNA-Bank wurde genutzt, um die mRNA-Sequenz dieses Enzyms zu finden und um sicherzustellen, dass keine weiteren Typ III-Polyketidsynthase-Sequenzen vorhanden waren. Bei der Expression des gefundenen Proteins Wdf3 wurden große Mengen von Einschlusskörpern des Enzyms gebildet und es konnte nicht vollständig gereinigt werden. Die Untersuchung des Rohextraktes zeigte jedoch, dass das Enzym aliphatische CoA-Ester akzeptiert und diese mit Malonyl-CoA umsetzt. Mit *n*-Hexanoyl-CoA konnte die Bildung einer Pyronstruktur durch Vergleich mit demselben Produkt von Wdf1 nachgewiesen werden. Es gab auch Hinweise, dass mit dem gleichen Substrat 2-Heptanon gebildet wird. Auch dieses Enzym führt also eine oder zwei Kondensationen mit Malonyl-CoA durch. Damit könnte es ein Kandidat für die Biosynthese der Gingerone sein. Für diese Stoffe wird eine Biosynthese aus einem aliphatischen Säure-CoA, Malonyl-CoA und Phenylpropanoyl-CoA diskutiert. Wdf3 könnte demnach für die erste Kondensation von aliphatischem Säure-CoA mit Malonyl-CoA verantwortlich sein. Gingerone und verwandte Verbindungen bleiben jedoch in *Wachendorfia thyrsiflora* noch nachzuweisen.

Alle in dieser Dissertation erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Synthese der Diarylheptanoide durch zwei verschiedene Enzyme durchgeführt wird. Die erste Kondensation eines Starter-CoA-Esters mit Malonyl-CoA wird durch Typ III-Polyketidsynthasen, bei *Wachendorfia thyrsiflora* Wdf1, katalysiert und führt zu einem Diketid- oder Triketid-Intermediat. Das zweite Enzym sollte dieses Intermediat mit einem weiteren Phenylpropanoyl-CoA-Ester zum Diarylheptanoid kondensieren. Zu welcher Enzymfamilie dieses Enzym gehört, ist bisher unbekannt. Um auch dieses Enzym zu charakterisieren, sind weitere Untersuchungen unter Verwendung biochemischer Methoden zur Proteinreinigung notwendig.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Hopper, S. D., Fay, M. F., Rossetto, M. & Chase, M. W.: A molecular phylogenetic analysis of the bloodroot and kangaroo paw family, Haemodoraceae: taxonomic, biogeographic and conservation implications. *Botanical Journal of the Linnean Society* **131**, 285-299 (1999).
2. Simpson, M. G.: Haemodoraceae. *The Families and Genera of Vascular Plants, vol. IV: Flowering Plants-Monocotyledons*, Springer, 1998.
3. Simpson, M. G.: Phylogeny and classification of the Haemodoraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **77**, 722-784 (1990).
4. Webb, L. J.: Bulletin No.232. *Guide to the Medicinal and Poisonous Plants of Queensland*, 65. Council for Scientific and Industrial Research, Melbourne, 1948.
5. Helme, N. A. & Linder, H. P.: Morphology, evolution and taxonomy of *Wachendorfia* (Haemodoraceae). *Bothalia* **22**, 59-75 (1992).
6. Ornduff, R.: Chromosome numbers and relationships of certain African and American genera of Haemodoraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **66**, 577-580 (1979).
7. Opitz, S. & Schneider, B.: Oxidative biosynthesis of phenylbenzoisochromenones from phenylphenalenones. *Phytochemistry* **62**, 307-312 (2003).
8. Cooke, R. G. & Thomas, R. L.: Coloring matters of Australian plants . 18. Constituents of *Anigozanthos rufus*. *Australian Journal of Chemistry* **28**, 1053-1057 (1975).
9. Hölscher, D. & Schneider, B.: HPLC-NMR analysis of phenylphenalenones and a stilbene from *Anigozanthos flavidus*. *Phytochemistry* **50**, 155-161 (1999).
10. Bick, I. R. C. & Blackman, A. J.: Hemodorrin. Phenalenone pigment. *Australian Journal of Chemistry* **26**, 1377-1380 (1973).
11. Opitz, S.: Phenylphenalenones and related phenolic pigments of the Haemodoraceae: structure, biosynthesis and accumulation patterns in *Xiphidium caeruleum* and *Wachendorfia thyrsiflora*. Biologisch-Pharmazeutische Fakultät. Universität Jena. Jena (2002).
12. Opitz, S., Otalvaro, F., Echeverri, F., Quinones, W. & Schneider, B.: Isomeric oxabenzochrysenones from *Musa acuminata* and *Wachendorfia thyrsiflora*. *Natural Product Letters* **16**, 335-338 (2002).
13. Cooke, R. G. & Segal, W.: Coloring matters of Australian plants. IV. Hemocorin: A unique glycoside from *Haemodorum corymbosum* Vahl. *Australian Journal of Chemistry* **8**, 107-113 (1955).
14. Cooke, R. G., Johnson, B. L. & Segal, W.: Coloring matters of Australian plants. VI. Hemocorin: the structure of the aglycon. *Australian Journal of Chemistry* **11**, 230-235 (1958).
15. Reid, D. H.: The chemistry of the phenalenes. *Quarterly Reviews* **19**, 274-302 (1965).
16. Della Greca, M., Lanzetta, R., Molinaro, A., Monaco, P. & Previtera, L.: Phenylene metabolites from *Eichhornia crassipes*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2**, 311-314 (1992).
17. Hölscher, D. & Schneider, B.: The biosynthesis of 8-phenylphenalenones from *Eichhornia crassipes* involves a putative aryl migration step. *Phytochemistry* **66**, 59-64 (2005).
18. Hölscher, D. & Schneider, B.: Phenalenones from *Strelitzia reginae*. *Journal of Natural Products* **63**, 1027-1028 (2000).
19. Luis, J. G., Fletcher, W. Q., Echeverri, F., Abad, T., Kishi, M. P. & Perales, A.: New phenalenone-type phytoalexins from *Musa acuminata* grand nain. *Natural Product Letters* **6**, 23-30 (1995).
20. Kamo, T., Hirai, N., Iwami, K., Fujioka, D. & Ohigashi, H.: New phenylphenalenones from banana fruit. *Tetrahedron* **57**, 7649-7656 (2001).
21. Binks, R. H., Greenham, J. R., Luis, J. G. & Gowen, S. R.: A phytoalexin from roots of *Musa acuminata* var. Pisang sipulu. *Phytochemistry* **45**, 47-49 (1997).
22. Hirai, N., Ishida, H. & Koshimizu, K.: A phenalenone-type phytoalexin from *Musa acuminata*. *Phytochemistry* **37**, 383-385 (1994).
23. Luis, J. G., Fletcher, W. Q., Echeverri, F. & Grillo, T. A.: Phenalenone-type phytoalexins from *Musa acuminata*. Synthesis of 4-phenylphenalenones. *Tetrahedron* **50**, 10963-10970 (1994).
24. Kamo, T., Hirai, N., Tsuda, M., Fujioka, D. & Ohigashi, H.: Changes in the content and biosynthesis of phytoalexins in banana fruit. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **64**, 2089-2098 (2000).
25. Schüller, G., Mithöfer, A., Baldwin, I. T., Berger, S., Ebel, J., Santos, J. G., Herrmann, G., Hölscher, D., Kramell, R., Kutchan, T. M., Maucher, H., Schneider, B., Stenzel, I., Wasternack, C. & Boland, W.: Coronalon: a powerful tool in plant stress physiology. *Febs Letters* **563**, 17-22 (2004).
26. Darwin, C.: *Die Entstehung der Arten*. Alfred Körner Verlag, Leipzig, 1938.
27. Hölscher, D. & Schneider, B.: A diarylheptanoid intermediate in the biosynthesis of phenylphenalenones in *Anigozanthos preissii*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 525-526 (1995).
28. Schmitt, B. & Schneider, B.: Dihydrocinnamic acids are involved in the biosynthesis of phenylphenalenones in *Anigozanthos preissii*. *Phytochemistry* **52**, 45-53 (1999).
29. Hölscher, D. & Schneider, B.: The biosynthetic origin of the central one-carbon unit of phenylphenalenones in *Anigozanthos preissii*. *Natural Product Letters* **7**, 177-182 (1995).

30. Hölscher, D. J.: Biosynthese und Strukturermittlung von Phenylphenalenonen aus *Anigozanthos preisii* Endl. Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät. Martin-Luther-Universität Halle. Halle-Wittenberg (1996).
31. Thomas, R.: Studies in biosynthesis of fungal metabolites. O. Biosynthesis of fungal perinaphthenones. *Biochemical Journal* **78**, 807-813 (1961).
32. Jang, D. S., Park, E. J., Hawthorne, M. E., Vigo, J. S., Graham, J. G., Cabieses, F., Santarsiero, B. D., Mesecar, A. D., Fong, H. H. S., Mehta, R. G., Pezzuto, J. M. & Kinghorn, A. D.: Constituents of *Musa x paradisica* cultivar with the potential to induce the phase II enzyme, quinone reductase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 6330-6334 (2002).
33. Schmitt, B., Hölscher, D. & Schneider, B.: Variability of phenylpropanoid precursors in the biosynthesis of phenylphenalenones in *Anigozanthos preissii*. *Phytochemistry* **53**, 331-337 (2000).
34. Claeson, P., Tuchinda, P. & Reutrakul, V.: Naturally occurring 1,7-diarylheptanoids. *Journal of the Indian Chemical Society* **71**, 509-521 (1994).
35. Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U. & Banerjee, R. K.: Turmeric and curcumin: biological actions and medicinal applications. *Current Science* **87**, 44-53 (2004).
36. Claeson, P., Pongprayoon, U., Sematong, T., Tuchinda, P., Reutrakul, V., Soontornsaratune, P. & Taylor, W. C.: Non-phenolic linear diarylheptanoids from *Curcuma xanthorrhiza*: A novel type of topical anti-inflammatory agents: Structure-activity relationship. *Planta Medica* **62**, 236-240 (1996).
37. Ammon, H. P. T., Anazodo, M. I., Safayhi, H., Dhawan, B. N. & Srimal, R. C.: Curcumin - a potent inhibitor of leukotriene-B<sub>4</sub> formation in rat peritoneal polymorphonuclear neutrophils (PMNL). *Planta Medica* **58**, 226 (1992).
38. Prasain, J. K., Tezuka, Y., Li, J. X., Tanaka, K., Basnet, P., Dong, H., Namba, T. & Kadota, S.: Six novel diarylheptanoids bearing chalcone or flavanone moiety from the seeds of *Alpinia blepharocalyx*. *Tetrahedron* **53**, 7833-7842 (1997).
39. Ali, M. S., Tezuka, Y., Banskota, A. H. & Kadota, S.: Blepharocalyxins C-E, three new dimeric diarylheptanoids, and related compounds from the seeds of *Alpinia blepharocalyx*. *Journal of Natural Products* **64**, 491-496 (2001).
40. Claeson, P., Panthong, A., Tuchinda, P., Reutrakul, V., Kanjanapothi, D., Taylor, W. C. & Santisuk, T.: Three non-phenolic diarylheptanoids with anti-inflammatory activity from *Curcuma xanthorrhiza*. *Planta Medica* **59**, 451-454 (1993).
41. Rao, B. S. & Shintre, V. P.: Coloring matter present in the rhizomes of *Curcuma aromatica* Salisb. *Journal of the Society of Chemical Industry, London* **47**, 54T (1928).
42. Hanawa, F., Shiro, M. & Hayashi, Y.: Heartwood constituents of *Betula maximowicziana*. *Phytochemistry* **45**, 589-595 (1997).
43. Yin, J., Kouda, K., Tezuka, Y., Le Tran, Q., Miyahara, T., Chen, Y. J. & Kadota, S.: New diarylheptanoids from the rhizomes of *Dioscorea spongiosa* and their antiosteoporotic activity. *Planta Medica* **70**, 54-58 (2004).
44. Morikawa, T., Tao, J., Ueda, K., Matsuda, H. & Yoshikawa, M.: Medicinal foodstuffs. XXXI. Structures of new aromatic constituents and inhibitors of degranulation in RBL-2H3 cells from a Japanese folk medicine, the stem bark of *Acer nikoense*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **51**, 62-67 (2003).
45. Yang, Y., Kinoshita, K., Koyama, K., Takahashi, K., Tai, T., Nunoura, Y. & Watanabe, K.: Two novel anti-emetic principles of *Alpinia katsumadai*. *Journal of Natural Products* **62**, 1672-1674 (1999).
46. Tezuka, Y., Gewali, M. B., Ali, M. S., Banskota, A. H. & Kadota, S.: Eleven novel diarylheptanoids and two unusual diarylheptanoid derivatives from the seeds of *Alpinia blepharocalyx*. *Journal of Natural Products* **64**, 208-213 (2001).
47. Kiuchi, F., Iwakami, S., Shibuya, M., Hanaoka, F. & Sankawa, U.: Inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **40**, 387-391 (1992).
48. Gonzalez-Laredo, R. F., Chen, J., Karchesy, Y. M. & Karchesy, J. J.: Four new diarylheptanoid glycosides from *Alnus rubra* bark. *Natural Product Letters* **13**, 75-80 (1999).
49. Smite, E., Lundegren, L. N. & Andersson, R.: Arylbutanoid and diarylheptanoid glycosides from inner bark of *Betula pentula*. *Phytochemistry* **32**, 365-369 (1993).
50. Wada, H., Tachibana, H., Fuchino, H. & Tanaka, N.: Three new diarylheptanoid glycosides from *Alnus japonica*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **46**, 1054-1055 (1998).
51. Kikuzaki, H. & Nakatani, N.: Cyclic diarylheptanoids from rhizomes of *Zingiber officinale*. *Phytochemistry* **43**, 273-277 (1996).
52. Araujo, C. A. C., Alegrio, L. V. & Leon, L. L.: Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. *Phytochemistry* **49**, 751-754 (1998).
53. Barton, D. H. R., Bracho, R. D., Potter, C. J. & Widdowson, D. A.: Phenol oxidation and biosynthesis. 24. Origin of chirality in erythrinar system and derivation of lactone rings alpha-erythroidine and beta-erythroidine. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **19**, 2278-2283 (1974).
54. Nasreen, A., Rueffer, M. & Zenk, M. H.: Cytochrome P-450-dependent formation of isoandrocybine from autumnaline in colchicine biosynthesis. *Tetrahedron Letters* **37**, 8161-8164 (1996).

55. Friederich, S., Rueffer, M., Asakawa, Y. & Zenk, M. H.: Cytochromes P-450 catalyze the formation of marchantins A and C in *Marchantia polymorpha*. *Phytochemistry* **52**, 1195-1202 (1999).
56. Tao, J., Morikawa, T., Toguchida, I., Ando, S., Matsuda, H. & Yoshikawa, M.: Inhibitors of nitric oxide production from the bark of *Myrica rubra*: Structures of new biphenyl type diarylheptanoid glycosides and taraxerane type triterpene. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **10**, 4005-4012 (2002).
57. Ali, M. S., Banskota, A. H., Tezuka, Y., Saiki, I. & Kadota, S.: Antiproliferative activity of diarylheptanoids from the seeds of *Alpinia blepharocalyx*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **24**, 525-528 (2001).
58. Gewali, M. B., Tezuka, Y., Banskota, A. H., Ali, M. S., Saiki, I., Dong, H. & Kadota, S.: Epicalyxin F and calyxin I: Two novel antiproliferative diarylheptanoids from the seeds of *Alpinia blepharocalyx*. *Organic Letters* **1**, 1733-1736 (1999).
59. Kadota, S., Prasain, J. K., Li, J. X., Basnet, P., Dong, H., Tani, T. & Namba, T.: Blepharocalyxins A and B, novel diarylheptanoids from *Alpinia blepharocalyx*, and their inhibitory effect on NO formation in murine macrophages. *Tetrahedron Letters* **37**, 7283-7286 (1996).
60. Prasain, J. K., Li, J. X., Tezuka, Y., Tanaka, K., Basnet, P., Dong, H., Namba, T. & Kadota, S.: Calyxin H, epicalyxin H, and blepharocalyxins A and B, novel diarylheptanoids from the seeds of *Alpinia blepharocalyx*. *Journal of Natural Products* **61**, 212-216 (1998).
61. Roughley, P. J. & Whiting, D. A.: Diarylheptanoids-problems of biosynthesis. *Tetrahedron Letters* **12**, 3741-3746 (1971).
62. Inoue, T., Kenmochi, N., Furukawa, N. & Fujita, M.: Biosynthesis of acerogenin A, a diarylheptanoid from *Acer nikoense*. *Phytochemistry* **26**, 1409-1411 (1987).
63. Edwards, J. M., Weiss, U. & Schmitt, R. C.: Biosynthesis of a 9-phenylperinaphthenone by *Lachnanthes tinctoria*. *Phytochemistry* **11**, 1717-& (1972).
64. Thomas, R.: Biosynthesis of plant phenalenone haemocorin. *Journal of the Chemical Society D-Chemical Communications*, 739-740 (1971).
65. Harmon, A. D., Edwards, J. M. & Highet, R. J.: Pigments of *L. tinctoria* Ell .8. Biosynthesis of 2,5,6-trihydroxy -9-phenylphenalenone by *Lachnanthes tinctoria* - Incorporation of phenylalanine-1-C-13. *Tetrahedron Letters* **18**, 4471-4474 (1977).
66. Schröder, J.: A family of plant-specific polyketide synthases: Facts and predictions. *Trends in Plant Science* **2**, 373-378 (1997).
67. Pieper, R., Luo, G. L., Cane, D. E. & Khosla, C.: Cellfree synthesis of polyketides by recombinant erythromycin polyketide synthases. *Nature* **378**, 263-266 (1995).
68. Jakobi, K. & Hertweck, C.: A gene cluster encoding resistomycin biosynthesis in *Streptomyces resistomycificus*, Exploring polyketide cyclization beyond linear and angucyclic patterns. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 2298-2299 (2004).
69. Kreuzaler, F. & Hahlbrock, K.: Enzymatic synthesis of an aromatic ring from acetate units. Partial purification and some properties of flavanone synthase from cell-suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *European Journal of Biochemistry* **56**, 205-213 (1975).
70. Reif, H. J., Niesbach, U., Deumling, B. & Saedler, H.: Cloning and analysis of two genes for chalcone synthase from *Petunia hybrida*. *Molecular and General Genetics* **199**, 208-215 (1985).
71. Ferrer, J. L., Jez, J. M., Bowman, M. E., Dixon, R. A. & Noel, J. P.: Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nature Structural Biology* **6**, 775-784 (1999).
72. Jez, J. M. & Noel, J. P.: Mechanism of chalcone synthase. pKa of the catalytic cysteine and the role of the conserved histidine in a plant polyketide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 39640-39646. (2000).
73. Heller, W. & Forkmann, G.: Biosynthesis of flavonoids. *The flavonoids: Advances in Research since 1986*, 499-535. Chapman & Hall, 1994.
74. Shirley, B. W.: Flavonoid biosynthesis: 'New' functions for an 'old' pathway. *Trends in Plant Science* **1**, 377-382 (1996).
75. Harborne, J. B. & Williams, C. A.: Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481-504 (2000).
76. Martin, C. R.: Structure, function and regulation of the chalcone synthase. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 147*, 233-284. Academic Press Inc, San Diego, 1993.
77. Jez, J. M., Bowman, M. E., Dixon, R. A. & Noel, J. P.: Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase. *Nature Structural Biology* **7**, 786-791 (2000).
78. Tropf, S., Karcher, B., Schröder, G. & Schröder, J.: Reaction mechanisms of homodimeric plant polyketide synthases (stilbene and chalcone synthase) - a single active site for the condensing reaction is sufficient for synthesis of stilbenes, chalcones and 6'-deoxychalcones. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 7922-7928 (1995).
79. Welle, R., Schröder, G., Schiltz, E., Grisebach, H. & Schröder, J.: Induced plant responses to pathogen attack - Analysis and heterologous expression of the key enzyme in the biosynthesis of phytoalexins in soybean (*Glycine max* L Merr Cv Harosoy-63). *European Journal of Biochemistry* **196**, 423-430 (1991).
80. Welle, R. & Grisebach, H.: Isolation of a novel NADPH-dependent reductase which coacts with chalcone synthase in the biosynthesis of 6'-deoxychalcone. *Febs Letters* **236**, 221-225 (1988).



81. Christensen, A. B., Gregersen, P. L., Schröder, J. & Collinge, D. B.: A chalcone synthase with an unusual substrate preference is expressed in barley leaves in response to UV light and pathogen attack. *Plant Molecular Biology* **37**, 849-857 (1998).
82. Abe, I., Takahashi, Y., Lou, W. W. & Noguchi, H.: Enzymatic formation of unnatural novel polyketides from alternate starter and nonphysiological extension substrate by chalcone synthase. *Organic Letters* **5**, 1277-1280 (2003).
83. Helariutta, Y., Elomaa, P., Kotilainen, M., Griesbach, R. J., Schröder, J. & Teeri, T. H.: Chalcone synthase-like genes active during corolla development are differentially expressed and encode enzymes with different catalytic properties in *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *Plant Molecular Biology* **28**, 47-60 (1995).
84. Durbin, M. L., McCaig, B. & Clegg, M. T.: Molecular evolution of the chalcone synthase multigene family in the morning glory genome. *Plant Molecular Biology* **42**, 79-92 (2000).
85. Hart, J. H.: Role of phytostilbenes in decay and disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **19**, 437-458 (1981).
86. Tropf, S., Lanz, T., Rensing, S. A., Schröder, J. & Schröder, G.: Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution. *Journal of Molecular Evolution* **38**, 610-618 (1994).
87. Borejsza-Wysocki, W. & Hrazdina, G.: Aromatic polyketide synthases - Purification, characterization, and antibody development to benzalacetone synthase from raspberry fruits. *Plant Physiology* **110**, 791-799 (1996).
88. Beckert, C., Horn, C., Schnitzler, J. P., Lehning, A., Heller, W. & Veit, M.: Styrylpyrone biosynthesis in *Equisetum arvense*. *Phytochemistry* **44**, 275-283 (1997).
89. Schröder, J.: Probing plant polyketide biosynthesis. *Nature Structural Biology* **6**, 714-716 (1999).
90. Liu, B. Y., Beuerle, T., Klundt, T. & Beerhues, L.: Biphenyl synthase from yeast-extract-treated cell cultures of *Sorbus aucuparia*. *Planta* **218**, 492-496 (2004).
91. Liu, B. Y., Falkenstein-Paul, H., Schmidt, W. & Beerhues, L.: Benzophenone synthase and chalcone synthase from *Hypericum androsaemum* cell cultures: cDNA cloning, functional expression, and site-directed mutagenesis of two polyketide synthases. *Plant Journal* **34**, 847-855 (2003).
92. Paniego, N. B., Zuurbier, K. W. M., Fung, S. Y., van der Heijden, R., Scheffer, J. J. C. & Verpoorte, R.: Phlorisovalerophenone synthase, a novel polyketide synthase from hop (*Humulus lupulus* L.) cones. *European Journal of Biochemistry* **262**, 612-616 (1999).
93. Baumert, A., Maier, W., Groger, D. & Deutzmann, R.: Purification and properties of acridone synthase from cell-suspension cultures of *Ruta graveolens* L. *Zeitschrift für Naturforschung C-a Journal of Biosciences* **49**, 26-32 (1994).
94. Raharjo, T. J., Chang, W. T., Choi, Y. H., Peltenburg-Looman, A. M. G. & Verpoorte, R.: Olivetol as product of a polyketide synthase in *Cannabis sativa* L. *Plant Science* **166**, 381-385 (2004).
95. Abe, I., Utsumi, Y., Oguro, S. & Noguchi, H.: The first plant type III polyketide synthase that catalyzes formation of aromatic heptaketide. *FEBS Letters* **562**, 171-176 (2004).
96. Bangera, M. G. & Thomashow, L. S.: Identification and characterization of gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Journal of bacteriology* **181**, 3155-3163 (1999).
97. Funa, N., Ohnishi, Y., Fujii, I., Shibuya, M., Ebizuka, Y. & Horinouchi, S.: A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature* **400**, 897-899 (1999).
98. Wang, C. Z., Maier, U. H. & Zenk, M. H.: Synthesis of 3,3',5-trihydroxybiphenyl-2-carboxylic acid, a component of the bitterest natural product amarogentin and its coenzyme A and N-acetyl cysteamine thiol esters. *Journal of Natural Products* **63**, 371-374 (2000).
99. Gilbert, I. H., Ginty, M., O'Neill, J. A., Simpson, T. J., Staunton, J. & Willis, C. L.: Synthesis of beta-keto and alpha,beta-unsaturated N-acetylcysteamine thioesters. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **5**, 1587-1590 (1995).
100. Baranovsky, A., Schmitt, B., Fowler, D. J. & Schneider, B.: Synthesis of new biosynthetically important diarylheptanoids and their oxo- and fluoro-analogues by three different strategies. *Synthetic Communications* **33**, 1019-1045 (2003).
101. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
102. Neuhoﬀ, V., Arold, N., Taube, D. & Ehrhard, W.: Improved staining of proteins in polyacrylamid gels including isoelectric-focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using coomassie brilliant blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-262 (1988).
103. Hölscher, D. & Schneider, B.: Phenylphenalenones from root cultures of *Anigozanthos preissii*. *Phytochemistry* **45**, 87-91 (1997).
104. Murashige, T. & Skoog, F.: A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497 (1962).
105. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H.: Specific enzymatic amplification of DNA invitro -the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on quantitative biology* **51**, 263-273 (1986).

106. Sambrook, J. & Russell, D. W.: Preparation of plasmid-DNA by alkaline lysis with SDS: Miniprep preparation. *Molecular cloning. A laboratory manual*, 1.32-1.34. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
107. Bradford, M. M.: Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254 (1976).
108. Corpet, F.: Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* **16**, 10881-10890 (1988).
109. Stöckigt, J. & Zenk, M. H.: Chemical syntheses and properties of hydroxycinnamoyl-coenzyme A derivatives. *Zeitschrift für Naturforschung C - A Journal of Biosciences* **30C**, 352-358 (1975).
110. Rinaldo, P., O'Shea, J. J., Welch, R. D. & Tanaka, K.: The enzymic basis for the dehydrogenation of 3-phenylpropionic acid: in vitro reaction of 3-phenylpropionyl-CoA with various acyl-CoA dehydrogenases. *Pediatric Research* **27**, 501-507 (1990).
111. Duran, E., Duran, H., Cazaux, L., Gorrichon, L., Tisnes, P. & Sarni, F.: Synthesis of S-phenyl-p-hydroxythiocinnamates as precursors of S-CoA esters. *Bulletin de la Societe Chimique de France*, 143-148 (1987).
112. Negrel, J. & Martin, C.: The biosynthesis of feruloyltyramine in *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* **23**, 2797-801 (1984).
113. Johns, N.: Synthesis and characterization of acylcoenzyme A derivatives of aromatic carboxylic acids. *Zeitschrift für Naturforschung, Teil C: Biochemie, Biophysik, Biologie, Virologie* **29**, 469-74 (1974).
114. Jacobs, A., Staunton, J. & Sutkowski, A. C.: Aspyrone biosynthesis in *Aspergillus melleus* - Identification of the intermediates formed on the polyketide synthase (PKS) in the 1st chain extension cycle leading to crotonate. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, 1113-1114 (1991).
115. Cane, D. E., Prabhakaran, P. C., Tan, W. T. & Ott, W. R.: Macrolide biosynthesis. 6. Mechanism of polyketide chain elongation. *Tetrahedron Letters* **32**, 5457-5460 (1991).
116. Kato, N., Hamada, Y. & Shioiri, T.: New methods and reagents in organic synthesis. 47. A general, efficient, and convenient synthesis of diarylheptanoids. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **32**, 3323-6 (1984).
117. Vig, O. P., Bari, S. S., Sattar, M. A., Sharma, S. & Mahajan, N.: New synthesis of alnustone, tagetone and dihydrotagetone from  $\beta$ -keto phosphonate. *Journal of the Indian Chemical Society* **66**, 98-100 (1989).
118. Asakawa, Y.: Chemical constituents of *Alnus sieboldiana*. III. Synthesis and stereochemistry of yashabushiketols. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **45**, 1794-1797 (1972).
119. Kamo, T., Kato, N., Hirai, N., Tsuda, M., Fujioka, D. & Ohigashi, H.: Phenylphenalenone-type phytoalexins from unripe Bungulan banana fruit. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **62**, 95-101 (1998).
120. Warburg, O. & Christian, W.: Isolation and crystallization of enolase. *Biochemische Zeitschrift* **310**, 384-421 (1942).
121. Jez, J. M., Bowman, M. E. & Noel, J. P.: Expanding the biosynthetic repertoire of plant type III polyketide synthases by altering starter molecule specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 5319-5324 (2002).
122. Morita, H., Noguchi, H., Schröder, J. & Abe, I.: Novel polyketides synthesized with a higher plant stilbene synthase. *European journal of biochemistry* **268**, 3759-66 (2001).
123. Abe, I., Sano, Y., Takahashi, Y. & Noguchi, H.: Site-directed mutagenesis of benzalacetone synthase. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 25218-25226 (2003).
124. Jez, J. M., Austin, M. B., Ferrer, J., Bowman, M. E., Schröder, J. & Noel, J. P.: Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases. *Chemistry & Biology* **7**, 919-930. (2000).
125. Schröder, J., Raiber, S., Berger, T., Schmidt, A., Schmidt, J., Soares-Sello, A. M., Bardshiri, E., Strack, D., Simpson, T. J., Veit, M. & Schröder, G.: Plant polyketide synthases: A chalcone synthase-type enzyme which performs a condensation reaction with methylmalonyl-CoA in the biosynthesis of C-methylated chalcones. *Biochemistry* **37**, 8417-8425 (1998).
126. Boitel-Conti, M., Laberche, J. C., Lanoue, A., Ducrocq, C. & Sangwan-Norreel, B. S.: Influence of feeding precursors on tropane alkaloid production during an abiotic stress in *Datura innoxia* transformed roots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **60**, 131-137 (2000).
127. Collakova, E. & DellaPenna, D.: The role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress. *Plant Physiology* **133**, 930-940 (2003).
128. Wang, C. C., Chen, L. G., Lee, L. T. & Yang, L. L.: Effects of 6-gingerol, an antioxidant from ginger, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *In Vivo* **17**, 641-645 (2003).
129. Park, K. K., Chun, K. S., Lee, J. M., Lee, S. S. & Surh, Y. J.: Inhibitory effects of [6]-gingerol, a major pungent principle of ginger, on phorbol ester-induced inflammation, epidermal ornithine decarboxylase activity and skin tumor promotion in ICR mice. *Cancer Letters* **129**, 139-144 (1998).
130. Denniff, P. & Whiting, D. A.: Biosynthesis of [6]-gingerol, pungent principle of *Zingiber officinale*. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, 711-712 (1976).

131. Rüedi, P. & Juch, M.: Chemistry and biological activities of long-chain alkyloxy -catechols of the [n]-gingerol-type. *Current Organic Chemistry* **3**, 623-646 (1999).
132. Petersen, M.: Purification of rosmarinic acid synthase from cell cultures of *Coleus blumei* Benth. *Planta* **191**, 18-22 (1993).
133. Petersen, M. & Simmonds, M. S. J.: Rosmarinic acid. *Phytochemistry* **62**, 121-125 (2003).
134. Ramaswamy, N. K. & Nair, P. M.: Aminolevulinic acid synthetase from cold-stored potatoes. *Biochimica et Biophysica Acta* **293**, 269-277 (1973).
135. Jordan, P. M. & Shemin, D.: Aminolevulinic acid synthetase. *Enzymes, 3rd Edition* **7**, 339-356 (1972).
136. Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. & Peitsch, M. C.: Swiss-Model: an automated protein homology - modeling server. *Nucleic Acids Research* **31**, 3381-3385 (2003).
137. Guex, N. & Peitsch, M. C.: Swiss -Model and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723 (1997).
138. Peitsch, M. C.: Protein modeling by E-mail. *Bio/Technology* **13**, 658-660 (1995).
139. Lukacin, R., Schreiner, S., Silber, K. & Matern, U.: Starter substrate specificities of wild-type and mutant polyketide synthases from Rutaceae. *Phytochemistry* **66**, 277-284 (2005).
140. Austin, M. B. & Noel, A. J. P.: The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural Product Reports* **20**, 79-110 (2003).

## Anhang

### **A1: Analytische Daten der Synthesen**

#### A1.1 Succinimid-Ester-Synthese

*Ferulasäure-Succinimidester*: Ansatz: 1 mmol (0.19 g), Ausbeute: 0.27 mmol (80 mg, 27 % d.Th. nach zweimaliger Trennung);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta$  7.85 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-3), 7.13 (1H, dd,  $J = 8.0$  und  $2.0$  Hz, H-6'), 7.06 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-2'), 6.95 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5'), 6.43 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-2), 3.95 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 2.88 (4H, s, Succinimid- $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ): C-Atome im Ferulasäureteil  $\delta$  164.2, 152.1, 125.9, 152.4, 150, 127.6, 116.9, 112.7, 109.4, 57.1, C-Atome im Succinimidteil  $\delta$  172.6 (2C), 27.1 (2C); EI-MS:  $m/z$  291  $[\text{M}]^+$ , 224, 208, 177 (100 %), 85, 83.

*Kaffeesäure-Succinimidester*: Ansatz: 0.91 mmol (0.16 g), Ausbeute: 0.13 mmol (36 mg, 15 % d.Th. nach Reinigung);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta$  7.79 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-3), 7.12 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-2'), 7.05 (1H, dd,  $J = 2.0, 8.0$  Hz, H-6'), 6.80 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5'), 6.44 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-2), 2.85 (4H, s, Succinimid- $\text{CH}_2$ ); EI-MS:  $m/z$  261, 178, 163, 162, 134, 85, 83 (100%), 71, 57.

*Dihydrokaffeesäure-Succinimidester*: Ansatz: 27 mmol (4.91 g), Ausbeute: 8.21 mmol (2.29 g, 30 % d.Th. nach zweimaliger Trennung);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta$  6.68 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5'), 6.67 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-2'), 6.57 (1H, dd,  $J = 8.0$  und  $2.1$  Hz, H-6'), 2.86 (4H, m, H-2 und H-3), 2.81 (4H, s, Succinimid- $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ): C-Atome im Dihydrokaffeesäure-Teil  $\delta$  169.8, 146.3, 144.9, 132.5, 120.7 (2C), 116.5 (2C), 33.9, 31.0, C-Atome im Succinimidteil  $\delta$  172.0 (2C), 26.5 (2C); EI-MS:  $m/z$  279  $[\text{M}]^+$ , 181, 165, 136, 123 (100 %), 114, 87.

*Dihydroferulasäure-Succinimidester*: Ansatz: 1 mmol (0.19 g), Ausbeute: 0.44 mol (129 mg, 44 % d.Th. nach zweimaliger Trennung);  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.85 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-5'), 6.74 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-2'), 6.71 (1H, dd,  $J = 8.1, 2.0$  Hz, H-6'), 3.89 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 2.99 (2H, t,  $J = 7.4$  Hz, H-3), 2.89 (2H, t,  $J = 7.4$  Hz, H-2), 2.84 (4H, s, Succinimid- $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): C-Atome im Dihydroferulasäure-Teil  $\delta$  168.0, 146.6, 144.2, 131.1, 120.9, 114.5, 110.9, 56.0, 33.2, 30.3, C-Atome im Succinimidteil  $\delta$  169.1 (2C), 25.6 (2C); EI-MS:  $m/z$  293  $[\text{M}]^+$ , 195, 179, 150, 137 (100 %), 114, 91, 87.

*o-Cumarsäure-Succinimidester*: Ansatz: 4 mmol (0.65 g), Ausbeute: 1.48 mol (0.39 g, 37 % d.Th. nach zweimaliger Trennung);  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{Aceton-}d_6$ ):  $\delta$  8.21 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-3), 7.72 (1H, dd,  $J = 7.8, 1.8$  Hz, H-6'), 7.34 (1H, ddd,  $J = 8.0, 2.0$  Hz, H-5'), 7.02 (1H, dd,  $J = 8.2, 1.2$  Hz, H-3'), 6.95 (1H, ddd,  $J = 8.0, 2.0$  Hz, H-4'), 6.89 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-2), 2.91 (4H, s, Succinimid- $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{Aceton-}d_6$ ): C-Atome im o-Cumarsäureteil  $\delta$  163.6 (C-1), 158.2 (C-2'), 146.0 (C-3), 133.7 (C-5'), 130.8 (C-6'), 121.6 (C-1'), 121.1 (C-4'), 117.3 (C-3'), 112.3 (C-2); C-Atome im Succinimidteil  $\delta$  170.6 (2C), 26.4 (2C); EI-MS:  $m/z$  261  $[\text{M}]^+$ , 224, 147 (100 %), 118, 103, 89.

*Phenylbrenztraubensäure-Succinimidester*: Ansatz: 10 mmol (1.64 g), Ausbeute: 0.2 mmol (46 mg, 2 % d.Th. nach zweimaliger Trennung);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.14 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-2'/6'), 7.68 (1H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-4'), 7.51 (2H, dd,  $J = 8.3, 7.6$  Hz, H-3'/5'), 3.94 (0.6H wegen H/D-Austausch aufgrund der Enolisierung, s, H-3), 2.90 (4H, s, Succinimid- $\text{CH}_2$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): C-Atome im Brenztraubensäureteil  $\delta$  168.9,

161.8, 134.9, 130.6 (2C), 128.8 (2C), 125.2, 37.6, C-Atome im Succinimidteil  $\delta$  169.2 (2C), 25.6 (2C).

*Zimtsäure-Succinimidester*: Ansatz: 5 mmol (0.74 g), Ausbeute: 3 mol (0.73 g, 60 % d.Th.);  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, Aceton- $d_6$ ):  $\delta$  7.98 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-3), 7.84 (2H, m,  $J = 8.0, 2.0$  Hz, H-2'/6'), 7.52 (3H, m, H-3'/5' und H-4'), 6.85 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-2), 2.93 (4H, s, Succinimid- $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, Aceton- $d_6$ ): C-Atome im Zimtsäureteil  $\delta$  163.1 (C-1), 150.4 (C-3), 134.7 (C-1'), 132.4 (C-4'), 130.0 und 129.8 (C-2'/6' und C-3'/5'), 112.9 (C-2); C-Atome im Succinimidteil  $\delta$  170.6 (2C), 26.3 (2C); EI-MS:  $m/z$  245  $[\text{M}]^+$ , 224, 131 (100 %), 103, 77.

*Dihydrozimtsäure-Succinimidester*: Ansatz: 5 mmol (0.75 g), Ausbeute: 2.5 mol (0.62 g, 50 % d.Th.);  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, Aceton- $d_6$ ):  $\delta$  7.32 (4H, m, H-2'/6' und 3'/5'), 7.22 (1H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-4'), 3.04 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-3), 2.97 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-2), 2.85 (4H, s, Succinimid- $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, Aceton- $d_6$ ): C-Atome im Dihydrozimtsäureteil  $\delta$  169.0 (C-1), 140.7 (C-1'), 129.4 und 129.3 (C-2'/6' und C-3'/5'), 127.3 (C-4'), 31.1 und 33.0 (C-2 und C-3); C-Atome im Succinimidteil  $\delta$  170.4 (2C), 26.3 (2C); EI-MS:  $m/z$  247  $[\text{M}]^+$ , 201, 149, 133, 105 (100 %), 91.

#### A1.2 Coenzym A (CoA)-Ester-Synthese

*Cinnamoyl-CoA*: Ansatz: 40  $\mu\text{mol}$ , Ausbeute: 5.9 mg (6.6  $\mu\text{mol}$  (16 % d.Th.).

*Caffeoyl-CoA*: Ansatz: 36 mmol, Ausbeute: 14.5 mg (15.6  $\mu\text{mol}$  (43 % d.Th.).

*Feruloyl-CoA*: Ansatz: 69 mmol, Ausbeute: 1.9 mg (2  $\mu\text{mol}$  (3 % d.Th.).

*Dihydrocaffeoyl-CoA*: Ansatz: 57 mmol, Ausbeute: 4.5 mg (4.9 mmol (8.6 % d.Th.).

*Dihydroferuloyl-CoA*: Ansatz: 58 mmol, Ausbeute: 14.0 mg (14.7 mmol (25 % d.Th.).

*Dihydrocinnamoyl-CoA*: Ansatz: 40 mmol, Ausbeute: 20.0 mg (22  $\mu\text{mol}$  (55 % d.Th.).

*o-Cumaroyl-CoA*: Ansatz: 76 mmol, Ausbeute: 4.5 mg (5  $\mu\text{mol}$  (6.6 % d.Th.).

*Phenylpyruvatoyl-CoA*: Ansatz: 57 mmol, Ausbeute: 4.3 mg (4.7  $\mu\text{mol}$  (8 % d.Th.).

#### A1.3 Diketid-N-Acetylcysteamin (NAC)-Derivate

*Dihydrocumarsäure-diketid-NAC* (3-Oxo-5-(4-Hydroxyphenyl)-pentanthiolsäure-S-(2)-acetyl-amino-ethyl-ester): Ansatz: 2.5 mmol (0.5 g) 3-(4-Acetyl-phenyl)-propionsäure. Ausbeute nach der DC: 0.25 mmol (66.5 mg, 14 % d. Th.). Analytische Daten:  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.03 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-2'/6'), 6.75 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-3'/5'), 5.41 (0.5H, s, H-2, Enolform), 3.65 (1.5H, s, H-2, Ketoform), 3.43 (2H, t,  $J = 6.0$  Hz,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.05 (2H, t,  $J = 6.0$  Hz,  $\text{SCH}_2$ ), 2.84 (4H, m, H-4 und H-5), 1.97 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); EI-MS:  $m/z$  309  $[\text{M}]^+$ , 279, 190, 149, 119, 107, 86, 71, 60 (100 %).

*Dihydrozimtsäure-diketid-NAC* (3-Oxo-5-phenyl-pentanthiolsäure-S-(2)-acetyl-amino-ethyl-ester): Ansatz: 3 mmol (0.5 g) Phenylpropionylchlorid. Ausbeute nach der SC: 0.56 mmol (161.4 mg, 19 % d. Th.). Analytische Daten:  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.27 (2H, m, H-3'/5'), 7.21 (1H, m, H-4'), 7.18 (2H, m, H-2'/6'), 5.46 (0.5H, s, H-2 Enolform), 3.69 (1.5H, s, H-2 Ketoform), 3.46 (2H, t,  $J = 6.0$  Hz,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.08 (2H, t,  $J = 6.0$  Hz,  $\text{SCH}_2$ ), 2.89 (4H, m, H-4 und H-5), 2.04 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); EI-MS:  $m/z$  293  $[\text{M}]^+$ , 243, 216, 201, 175, 147, 133, 119, 105, 86, 72, 60 (100 %).

*p-Cumarsäure-diketid-NAC* (5-(4-Hydroxy-phenyl)-3-hydroxy-penta-2,4-dienthiolsäure-S-(2)-acetyl-amino-ethyl-ester): Ansatz: 7.42 mmol *O*-Acetylcumarsäure (1.54 g), Ausbeute: 0.14

mmol *p*-Cumarsäure-diketid-NAC (50 mg, 3 % d. Th.). Analytische Daten:  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) Enolform:  $\delta$  7.43 (d,  $J = 15.9$  Hz, H-5), 7.18 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-2'/6'), 6.72 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-3'/5'), 6.37 (d,  $J = 15.9$  Hz, H-4), 5.67 (s, H-2 Enolform), 4.03 (s, H-2 Ketoform), 3.46 (2H, t,  $J = 6.0$  Hz,  $\text{NH-CH}_2$ -), 3.08 (2H, t,  $J = 6.0$  Hz,  $\text{S-CH}_2$ -), 2.04 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), Integration wegen H/D-Austausch aufgrund der Enolisierung und Signalüberlagerung z.T. nicht möglich; EI-MS:  $m/z$  307  $[\text{M}]^+$ , 220, 189, 160, 147, 119, 91, 72, 60 (100 %).

*Zimtsäure-diketid-NAC* (3-Oxo-5-phenyl-pent-4-enthioisäure-*S*-(2-acetylamino-ethyl)-ester): Ansatz: 10 mmol Zimtsäure-Chlorid (1.66 g), Ausbeute: 0.14 mmol *p*-Cumarsäure-diketid-NAC (0.58 g, 20 % d. Th.). Analytische Daten:  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.53 (d,  $J = 15.9$  Hz, H-5), 7.43-7.35 (5H, m, H-Phenyl), 6.37 (d,  $J = 15.9$  Hz, H-4), 5.62 (s, H-2 Enolform), 3.96 (s, H-2 Ketoform), 3.50 (2H, t,  $J = 6.0$  Hz,  $\text{NH-CH}_2$ -), 3.13 (2H, t,  $J = 6.0$  Hz,  $\text{S-CH}_2$ -), 1.98 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), Integration wegen H/D-Austausch aufgrund der Enolisierung und Signalüberlagerung z.T. nicht möglich; EI-MS:  $m/z$  266, 230, 171, 144, 131 (100 %), 103, 77, 72.

#### A1.4 Diarylheptanoide

(4*E*)-1,7-Diphenyl-hept-4-en-3-on: Ansatz: 30 mmol (4.4 ml) Phenylpropionylchlorid, Ausbeute: 0.8 mmol (222 mg, 14 % d. Th.). Analytische Daten:  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.28 (2H, m, H-3''/5''), 7.27 (2H, m, H-3'/5'), 7.19 (2H, m, H-4' und H-4''), 7.18 (2H, m, H-2'/6'), 7.16 (2H, m, H-2''/6''), 6.84 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-5), 6.11 (1H, dt,  $J = 15.9$  Hz, 6.8 Hz, H-4), 2.92 (2H, t,  $J = 7.9$  Hz, H-1), 2.84 (2H, t,  $J = 7.9$  Hz, H-2), 2.76 (2H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-7), 2.52 (2H, m, H-6);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  199.5 (C-3), 146.2 (C-5), 130.7 (C-4), 141.2 (C-1'), 140.7 (C-1''), 128.51 und 128.47 (C-2'/6' und C-2''/6''), 128.35 und 128.33 (C-3'/5' und C-3''/5''), 126.2 und 126.1 (C-4' und C-4''), 41.6 (C-2), 34.4 (C-7), 34.1 (C-6), 30.1 (C-1); EI-MS:  $m/z$  264  $[\text{M}]^+$ , 159, 105, 91 (100 %), 69.

(4*E*,6*E*)-1,7-Diphenyl-hept-4,6-dien-3-on: Ansatz: 4.2 mmol (1.08 g) (2-Oxo-4-phenyl-butyl)-phosphonsäure-dimethylester, Ausbeute: 0.34 mmol (90 mg, 8 % d. Th.). Analytische Daten:  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.46 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-2''/6''), 7.35 (2H, m, H-3''/5''), 7.32 (1H, m, H-4''), 7.32 (1H, dd,  $J = 15.5, 10.1$  Hz, H-5), 7.29 (2H, m, H-3'/5'), 7.22 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-2'/6'), 7.20 (1H, m, H-4'), 6.93 (1H, d,  $J = 15.5$  Hz, H-7), 6.87 (1H, dd,  $J = 15.5, 10.1$  Hz, H-6), 6.28 (1H, d,  $J = 15.5$  Hz, H-4), 2.97 (2H, m, H-1), 2.93 (2H, m, H-2);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  199.4 (C-3), 142.7 (C-5), 141.4 (C-7), 141.3 (C-1'), 136.0 (C-1''), 129.5 (C-4), 129.2 (C-4''), 128.8 (C-2'/6'), 128.5 (C-3'/5'), 128.4 (C-3''/5''), 127.2 (C-2''/6''), 126.7 (C-6), 126.1 (C-4'), 42.3 (C-1), 30.2 (C-2); EI-MS:  $m/z$  263  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 262  $[\text{M}]^+$ , 171, 157, 128, 115, 105, 91 (100 %), 77, 65.

(4*E*,6*E*)-3-Hydroxy-1,7-diphenyl-hepta-4,6-dien: Ansatz: 77  $\mu\text{mol}$  (20.2 mg) (4*E*,6*E*)-1,7-Diphenyl-hept-4,6-dien-3-on, Ausbeute: 57  $\mu\text{mol}$  (15 mg, 73 % d. Th.). Analytische Daten:  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.46 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-2''/6''), 7.32 (2H, m, H-3''/5''), 7.27 (2H, m, H-3'/5'), 7.24 (2H, m, H-2'/6'), 7.22 (1H, m, H-4''), 7.16 (1H, m, H-4'), 6.92 (1H, dd,  $J = 15.4, 10.8$  Hz, H-6), 6.59 (1H, d,  $J = 15.4$  Hz, H-7), 6.42 (1H, dd,  $J = 15.2, 10.8$  Hz, H-5), 5.94 (1H, dd,  $J = 15.2, 6.2$  Hz, H-4), 4.20 (1H, m, H-3), 3.97 (1H, d,  $J = 4.7$  Hz, OH-3), 2.75 (2H, m, H-1), 1.83 (2H, m, H-2);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  143.1 (C-1'), 139.4 (C-4), 138.4 (C-1''), 132.6 (C-7), 130.6 (C-5), 129.9 (C-6), 129.6 (C-3''/5''), 129.4 (C-2'/6'), 129.3 (C-3'/5'), 128.4 (C-4''), 127.3 (C-2''/6''), 126.7 (C-4'), 71.4 (C-3), 40.5 (C-2), 32.6 (C-1); EI-MS:  $m/z$  265  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 264  $[\text{M}]^+$ , 159, 133, 128, 115, 105, 91 (100 %), 77, 65.

*5-Hydroxy-1,7-diphenyl-heptan-3-on*: Ansatz: 1.32 mmol (0.17 ml) Propionaldehyd, Ausbeute: 0.9 mmol (238 mg, 66 % d. Th.). Analytische Daten:  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{Aceton-}d_6$ ):  $\delta$  7.25 (4H, m, H-3'/5' und H-3''/5''), 7.20 (4H, m, H-2'/6' und H-2''/6''), 7.15 (2H, m, H-4' und H-4''), 4.04 (1H, m, H-5), 2.81 (4H, s, H-1 und H-2), 2.72 (1H, m, H-7a), 2.64 (1H, m, H-7b), 2.59 (2H, d,  $J = 6.3$  Hz, H-4), 1.70 (2H, m, H-6);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  210.9 (C-3), 141.8 (C-1'), 140.7 (C-1''), 128.5, 128.45, 128.4, 128.3 (C-2'/6', C-3'/5', C-2''/6'', C-3''/5''), 126.2 und 125.9 (C-4' und C-4''), 66.9 (C-5), 49.4 (C-4), 45.0 (C-2), 38.1 (C-6), 31.7 (C-7), 29.5 (C-1); EI-MS:  $m/z$  282  $[\text{M}]^+$ , 164, 159, 148, 133, 117, 105, 91 (100 %), 77, 65.

*3,5-Diketo-1,7-diphenyl-heptan*: Ansatz: 180  $\mu\text{mol}$  (51.4 mg) 5-Hydroxy-1,7-diphenyl-heptan-3-on, Ausbeute: 11  $\mu\text{mol}$  (3 mg, 6 % d. Th.). Analytische Daten:  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.28 (4H, m, H-3'/5'/3''/5''), 7.20 (2H, m, H-4'/4''), 7.18 (4H, m, H-2'/6'/2''/6''), 5.24 (1H, s, H-4), 2.92 (4H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-1/7), 2.58 (4H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-2/6);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  193.1 (C-3/5), 140.7 (C-1'/1''), 128.5 (C-3'/5'/3''/5''), 128.3 (C-2'/6'/2''/6''), 126.2 (C-4'/4''), 99.6 (C-4), 40.2 (C-2/6), 31.5 (C-1/7); EI-MS:  $m/z$  280  $[\text{M}]^+$ , 175, 133, 105, 91 (100 %).

## A2: Verwendete Primer

Für die Arbeit wurden die hier aufgeführten Primer verwendet. Bei K180\_oli und FGFG\_oli handelt es sich um degenerierte Primer. In den Klammern ist die jeweilige Variation bezeichnet. I steht für Desoxy-inosintriphosphat. Diese künstliche Base kann mit allen anderen paaren.

|                     |     |  |     |
|---------------------|-----|--|-----|
| K180_oli            | 5'- | GCIAA(AG)GA(CT)ITI GCI GA(AG)AA(CT)AA(CT)AAIGG | -3' |
| FGFG_oli            | 5'- | CC(AT)GG(AT)CCGAA(GT)CCGAA(GT)AG(GT)AC(AT)CCC  | -3' |
| dhs05_wdf5race      | 5'- | TGT TCT ACG AGC GGG AGG CC                     | -3' |
| dhs06_wdf3race      | 5'- | GCC TTT GAG CCG CTG AAC ATC                    | -3' |
| dhs07_wdf5_2        | 5'- | CCG CCT GGG TGG ACG ATC C                      | -3' |
| dhs20_wdf_chs1_Bam  | 5'- | AAG GAT CCG CGA GCA CAG AAG GCA TCC AGG        | -3' |
| dhs21_wdf_chs1_Hind | 5'- | TAA AGC TTC TAA ATC GAG AGC GGC ACA CTG        | -3' |
| dhs31_wdf2_5Race    | 5'- | GTC CGG GAC ATT GGT CTG GC                     | -3' |
| dhs32_wdf2_5Race    | 5'- | GGG CGC CGT AGT AGA CCT CG                     | -3' |
| dhs33_wdf2_3Race    | 5'- | CTT CGA GGT CTA CTA CGG CGC CC                 | -3' |
| dhs34_wdf_chs2_B    | 5'- | AAG GAT CCT TGA ACA TCA AGG AGT TCC GC         | -3' |
| dhs35_wdf-chs2_H    | 5'- | TAA AGC TTT TAA AGC GAA ACG CGT CGG AGG        | -3' |
| dhs36_wdf_chs3_H    | 5'- | TAA AGC TTT TAA TTA AGC GAA ACG CTG CG         | -3' |
| dhs37_wdf_chs3_B    | 5'- | AAG GAT CCG CGA ACA ATA TCA AGG AGC            | -3' |
| wdf3_mut2_for       | 5'- | GCT GGG GCT GCA GCC GGA GAA GAT C              | -3' |
| wdf3_mut2_rev       | 5'- | GAT CTT CTC CGG CTG CAG CCC CAG C              | -3' |
| M13reverse          | 5'- | CAG GAA ACA GCT ATG AC                         | -3' |
| M13forward          | 5'- | GTA AAA CGA CGG CCA G                          | -3' |
| pHis8_for           | 5'- | CGA AAT TAA TAC GAC TCA C                      | -3' |
| pHis8_rev           | 5'- | CTT CCT TTC GGG CTT TGT TAG                    | -3' |



In diesem Anhang wurden die mRNA-Sequenzen der gefundenen Typ III Polyketidsynthasegene verzeichnet. Dabei wurde der translatierte Bereich, der die Proteine kodiert, grau unterlegt.

CCACUGUAAAUAACCUAACUCUAUCCAGUACUCCUUUUUUUGGGAGACUUGCUAUAUCAGUUCGACCCUUCUCAA  
CUUGUCCUCGUCUGUACAUCAGAAACCCUAACUCUCAUCCUAUCAAUUCUAUCUAUAUGGCGAGCACAGAAGGC  
AUCCAGGCUUACCGGAACAACUAGGCUGAAGGCCCGGCGACCAUAUAGGCCAUUCGGCACUGCCAACCCUCCAAC  
GUCGUCGACGCGAGACCUUCCUGACUACUACUGGCGGGUCACCAACUCCGAGCAUCUGUCCCUAGAGUACAG  
GUGAAGCUC AAGCGUAUUUGUGAGAGAUCAUCGAUCAGGAAGAGGCAUUUGGUCCUCACAGAGCAGUUGCUGAAG  
GAAAACCCACGUCGACCACCUACGUCGAUGCGUCCUAUGACGAGCGCCAGUCCAUCGUGCUGGAUGCCGUGCCG  
AAGCUGGCCUCGCGAGGCGGCGGCGAAGGCCAUCAAGGAUUGGGGCCGCGCGAAGACGGACAUCACUCACAUGGUC  
GUCUGCACCGGCGCAGGUGUGGACGUCUCCCGCGCGUCGACUACAAGAUGAUGAACCUCCUCGGCCUCCCGCCGACG  
GUGAACCGCGUACUGCUUUACAACGUUGGUCGACCGCACGCGCACCGGCUCCGCAUAGCCAAAGGACCGUGCC  
GAGAAUAACAAGGCGCCCCGUGUCCUGUGGAGCUCGAGGUCAGCGUCAUUGUUCUCCGCGGCCCGCGCGAG  
GGCGACGUCGAGAUCCUCCUGGGUCAGGCCCUUCUGGGGAUGGCUCCGCGAGCUAUCAUUGUAGGAGCAGACCCG  
AUCGAGGGGGUGGAGAAGCCAAUCUUC CAGAUUCUUCUGGCGUCCAGAUAGACUCUGCCGAGGGCGAGCAUCU  
GUCGUGGGCACCUAGGGAGCUCGGUCUGACCUCCACCUGAAGCCACAGCUGCCGAACACCGUCUCCAGCAAC  
AUCCACAAGCCACUAAGAAGGCCUUUGAGCCGUGAACAUACUGACUGGAACUCGAUCUUCUGGAUCGUCAC  
CCAGGCGGUCGCGCCAUCUAGACCAGGUUCAGGAGAAGAU CGGACUUGAGGAGAAACAAGCUCGACGUGUC CAGG  
UACGUGCUGGCGGAGAACGGCAACAUGAUGAGUGCCUCCGUCUUCUUCAUCAUGGACGAGAUGAGGAAGCGCUCG  
GCGGCGCAAGGCGUCUCCACCACCGGUGAGGGGCCACGAGUGGGGGGUGUCUUCGGCUUCGGCCAGGUCUGAGC  
AUCGAGACUGUCGUCUCCACAGUGUGCCGCUUCGAUUUAGUGUUCGGCGAUCUCUUGACAGAGGAGAU CGGA  
AACUGUAAUUUCCUUC CACGGUUUAUGUUUUGUUGAUUAAAUUAUGCAUACACGUACAUCUGAGCUUGGAAAAA  
AAAAAAAAAAAA

[illegible]

Abb. A3.2: Sequenz der mRNA von *wdf2* aus *Wachendorfia thyrsiflora*.

```
ATGGCGAACAATATCAAGGAGCTCCGCAAAGCTCAGAGAGCTCAAGGACCGGCCACCGTCATGGCCATCGGCACC  
GCTAACCCCTGACAACATTGTGACACAGAGCACTTACGCCGACTACTACTTCCGCATCACCAACTCCGAGCACAAG  
CCGGAGCTCAAGAAGAAGTTCCAGCGCATCTGCGATAGATCTGGGATCAAGAAGAGGCACATCTTCGTGACGGAG  
GAGATTCTGAAGCAGAGGCCGAGCATGTGTGGCTACATGACGCAGTCCTTCGACCACCGTCAGGACATCGTCGTG  
GAGGAGGTGCCGAAACTTGCCAAGATCGCCGCCGAGCGGGCGCTCAAGGAGTGGGGGCGACCCAAGTCGGAGCTC  
ACCCACCTGGTCTTCTGCTCGACCTCCGGCATCGACATGCCCGGAGCAGACGTCCAGCTTATCAAGCTCCTCGAC  
CTCCCACTGAACATCAACCGGGTCATGCTCTACTGCCAGGCCTGCCACATGGGCGCCTCCATGATGCGTATCGTC  
AAGGACCTCGCCGAGAACAACAAGGGCGCCCGCGTCCTGATGGTCTCCTCCGAGATCACCGCCACAGCTTCCGA  
GGCCCCAGCGAGACCAACGTCCCGGACCTCGGTGGCCAGGCCACGTTCCGCCGACGGAGCAGCCGCTTTGGTGGTG  
GGCGCTGACCCGATCGAGGGCCTGGAGAAGCCCATCTTCGAGGTCTACTACGGCGCCAGACGACGATGCCGGAC  
ACTCCAGGGCGGTGCGTGGCCACTTCGAGCAGGTGGGGCTGACCTTCCACACCTTGCCAAACCTGCCACAGCTC  
GTGGCTAACAAACATTGGCAACTGTCTGATGACGGCGTTCAAGCCGACCGGGATTACCGACTGGAATAAGGTATTCT  
TGGGTGCTGCACCTTGGAACCTCGGCGATCATGGACGCGGTACAGGTGAAGCTGGGGCTG CAGCCGGAGAAGATC  
AGGACATCGAGGAAGATCTTCAGCGAGTACGGCAACATGTTTCAGCGCGACCGTCCTCTTCGTCATGGACCAGGTC  
AGGAAGGAGTCAGCGGCGGAAGGGTTCTCCACCACCGGCCACGGCCACGAGTGGGGGGTCATGTTTCGGCTTCGGT  
CCCGGTCTGAGCATCGAGACTGTCTGTCCTCCGCAGCGTTTCGCTTAAT TAA
```

Abb. A.3.3: Sequenz des Gens *wdf3*. Die nichtcodierenden Sequenzen konnten in pExCell nicht sicher bestimmt werden und waren in pCR®II-TOPO® nicht mehr vorhanden. Das mutierte Codon (CAG für Glutamin) wurde rot markiert.

#### A4: Massenspektrometrisch nachgewiesene Proteinsequenzen

Tabelle A4.1: Massenspektrometrisch nachgewiesene Fragmente und die zugehörigen Sequenzen im Protein Wdf1: Spaltprodukte mit Trypsin.

| Masse (Da) | Sequenz                |
|------------|------------------------|
| 2277.63    | TDITHMVVCTGAGVDVPGVDYK |
| 1873.84    | ENPTLTITYVDASYDER      |
| 1471.78    | MMNLLGLPPTVNR          |
| 1431.68    | VTNSEHLSPEYR           |
| 1314.47    | PEGEHLVAGHLR           |
| 1193.45    | HLVLTEQLLK             |
| 1069.62    | QSIVLDAVPK             |
| 1067.56    | FWIVHPPGGR             |
| 1043.19    | AILDQVEQK              |

Tabelle A4.2: Massenspektrometrisch nachgewiesene Fragmente und die zugehörigen Sequenzen im Protein Wdf1: Spaltprodukte mit GluC.

| Masse (Da) | Sequenz                   |
|------------|---------------------------|
| 2840.31    | MKHHHHHHHGGGLVPRGSHGSASTE |
| 2200.06    | QLLKENPTLTITYVDASYDE      |
| 1852.95    | KPIFQIFSASQMTLPE          |
| 1478.77    | WGVLFQFGPGLSIE            |
| 1406.76    | NKLDVSRVLAEE              |
| 1266.59    | GIQAYRNNMAE               |
| 1239.62    | VSVMFRRGPAE               |
| 1217.64    | GEHLVGHLRE                |
| 1031.57    | HLVAGHLRE                 |
| 801.48     | AAAKAIKE                  |
| 688.39     | KIGLEE                    |

Tabelle A4.3: Massenspektrometrisch nachgewiesene Fragmente und die zugehörigen Sequenzen im Protein Wdf2: Spaltprodukte mit Trypsin.

| Masse (Da) | Sequenz   |
|------------|---|
| 5432.66    | GPSQTNVPDLGGQATFADGAAALVVGADPIEGLEKPIFEVYYGAQTTMPDTPR |
| 3554.69    | ESAAEGMSTTGHGLEWGMFGFGPGLSIETVVLR                     |
| 3265.51    | AQGPATVMAIGTANPDNIVDQSTYADYYFR                        |
| 2614.27    | IFSEYGNMFSATVLFVMDGVRK                                |
| 2486.17    | IFSEYGNMFSATVLFVMDGVR                                 |
| 2127.27    | VFWVLHPGNTAIMDAIQAK                                   |
| 1694.83    | HHHHHHHHHGGGLVPR                                      |
| 1592.81    | VLMVSSEITAHSFR  |
| 1384.79    | RHIFVTEEILK   |
| 1228.69    | HIFVTEEILK  |
| 1167.71    | LLDLPLTINR  |
| 1141.61    | QDIVVDEVPK  |

Tabelle A4.4: Massenspektrometrisch nachgewiesene Fragmente und die zugehörigen Sequenzen im Protein Wdf3: Spaltprodukte mit Trypsin.

| Masse (Da) | Sequenz                            |
|------------|------------------------------------|
| 3562.70    | ESAAEGFSTTGHGHEWGVMFGFGPGLSIETVVLR |
| 3265.51    | AQGPATVMAIGTANPDNIVDQSTYADYYFR     |
| 2661.32    | SELTHLVFCSTSGIDMPGADVQLIK          |
| 2582.28    | KIFSEYGNMFSATVLFVMDQVR             |
| 2582.28    | IFSEYGNMFSATVLFVMDQVRK             |
| 2454.18    | IFSEYGNMFSATVLFVMDQVR              |
| 2127.10    | VFWVLHPGNSAIMDAVQVK                |
| 2014.87    | QRPSMCGYMTQSFDHR                   |
| 1831.76    | VMLYCQACHMGASMMR                   |
| 1694.83    | HHHHHHHHGGLVPR                     |
| 1592.81    | VLMVSSEITAHSFR                     |
| 1423.79    | ITNSEHKPELKK                       |
| 1384.79    | RHIFVTEEILK                        |
| 1295.69    | ITNSEHKPELK                        |
| 1228.69    | HIFVTEEILK                         |
| 1180.70    | LLDLPLNINR                         |
| 1155.63    | QDIVVEEVPK                         |
| 1143.64    | IVKDLAENNK                         |
| 1084.63    | ALKEW GRPK                         |
| 1053.64    | LGLQPEKIR                          |
| 1041.51    | GSHGGSANNIK                        |
| 784.46     | LGLQPEK                            |
| 772.41     | EWGRPK                             |

## **Danksagung**

Folgenden Leuten möchte ich für ihre Hilfe während der Zeit, die ich als Doktorand in Jena verbrachte, besonders danken:

- Meinem Betreuer PD Dr. Bernd Schneider für die Überlassung dieses sehr interessanten Themas, Hilfe bei der Durchführung komplizierter NMR-Experimente, stundenlange hilfreiche Diskussionen über den Fortgang der Arbeit und während des Schreibens dieses Manuskripts.
- Prof. Dr. Joachim Schröder für die ausführlichen fachlichen Diskussionen zu Polyketidsynthasen, seiner Hilfe beim Einstieg in das Thema, seine ständige Bereitschaft unsere Sequenzen zu analysieren und die Überlassung von Primern und Starter-CoA-Estern.
- Prof. Dr. Ulrich Pommer für seine Unterstützung als Betreuer aus der Fakultät und bei der Korrektur dieser Dissertation sowie sein Interesse an meiner Arbeit.
- Prof. Dr. Jonathan Gershenzon für die Erlaubnis die Geräte und Labore seiner Arbeitsgruppe mitbenutzen zu dürfen.
- Dr. Dirk Hölscher für die fruchtbare Zusammenarbeit und seine Vorarbeiten, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, seine Hilfe beim Einstieg in mir neue Techniken sowie bei der Korrektur des Manuskriptes.
- Dr. Aleš Svatoš für die Durchführung der HPLC-MS-Experimente.
- Dr. Gudrun Schröder für ihre Hilfe bei der praktischen Durchführung der Experimente: des Western Blots, der Proteinexpression und -reinigung und ihr ebenfalls reges Interesse an dieser Arbeit.
- PD Dr. Jörg Müller und seiner Arbeitsgruppe „Mikrobielle Proteintranslokation“ für die Überlassung der French Press, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.
- Dr. Renate Ellinger für die Hilfe mit den NMR-Geräten und ihre Unterstützung während dieser Zeit und bei der Korrektur des Manuskriptes.
- Andrey Antonchick für die Durchführung von Synthesen und seine Hilfe bei meinen synthetischen Arbeiten sowie sein Vertrauen in mich.
- Bettina Raguschke für die Durchführung von Sequenzierungen.
- Sybille Koch und Sybille Lorenz für die MS-Messungen der synthetisierten Verbindungen.
- Dr. Michael Reichelt für seine Unterstützung beim Umgang mit den HPLC-Geräten.
- Dr. Axel Schmidt für seine Hilfe im Isotopenlabor.

- Kati Gruner für die Durchführung von Arbeiten zur Phytochemie von *Wachendorfia thyrsoiflora* und die Anzucht der Kulturen.
- Sonja Rosenlöcher und Ursula Eberhardt für die Hilfe bei der Kultivierung der Wurzelkulturen.
- Allen früheren und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für ihre Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und das sehr gute Arbeitsklima: Dr. Stefan Opitz, Dr. Stan Fowler, Dr. Christian Paetz, Felipe Otalvaro, Kusuma Jitsaeng, Tobias Munde, Dr. Shenghong Li, Dr. Olga Konstantinova, Dr. Inna Kuzovkina.
- Den HiWi's Friederike, Kati und Sandy für die Hilfe bei den Synthesen, Martin für die Unterstützung bei den Arbeiten zur Enzymkinetik und außerdem Julia, Jens, Susi und Marion.
- Meinen Freunden aus der MS-Gruppe: Madina, Petra, Petra, Antje, Alexander.
- Meinen Eltern Wolfgang und Jutta, meiner Schwester Astrid - dafür dass man mit ihnen über etwas anderes reden muss als Arbeit.

Schließlich möchte ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Max-Planck-Gesellschaft für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes danken.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Silke Brand  
Geburtsdatum: 5. Mai 1978  
Geburtsort: Altenburg  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

### Schulausbildung:

|                      |   |
|----------------------|---|
| Sep.1984 - Juli 1987 | Teiloberschule Gerstenberg              |
| Sep.1987 - Juli 1991 | Polytechnische Oberschule Windischleuba |
| Sep.1991 - Juni 1996 | Gymnasium Platanenstraße, Altenburg     |

### Studium:

|                       |  |
|-----------------------|--|
| Okt. 1996 - März 2001 | Universität Leipzig, Studiengang Biochemie.  |
| Sep. 2000 - März 2001 | Diplomarbeit: „Gewinnung der Ferredoxinreduktase aus <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> EB 104 durch heterologe Expression in <i>Escherichia coli</i> “. |

### Promotion:

|                       |   |
|-----------------------|---|
| Juni 2001 - März 2005 | Doktorand am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Arbeitsgruppe Biosynthese/NMR, Betreuer: PD Dr. Bernd Schneider und Prof. Dr. Ulrich Pommer. |
|-----------------------|---|

### Berufliche Tätigkeit:

|                |  |
|----------------|--|
| Seit März 2005 | wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Arbeitsgruppe Biosynthese/NMR. |
|----------------|--|

Jena, den 7.4.2005

Silke Brand

## **Selbstständigkeitserklärung**

Entsprechend der geltenden, mir bekannten Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig angefertigt und alle von mir benutzten Hilfsmittel und Quellen angegeben habe. Alle Personen, die mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben, sind in der Danksagung genannt. Es wurde weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch haben Dritte für Arbeiten, welche im Zusammenhang mit dem Inhalt der Dissertation stehen, geldwerte Leistungen erhalten. Die vorgelegte Dissertation wurde außerdem weder als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung noch als Dissertation an einer anderen Hochschule eingereicht.

Jena, den 7.4.2005

Silke Brand



## **Publikationen und Vorträge**

### Publikationen:

- (1) Brand, S., Hölscher, D. J., Schröder, J., Schröder, G., Svatoš, A., Schierhorn, A. & Schneider, B.: A polyketide synthase from *Wachendorfia thyrsiflora* and its role in the biosynthesis of phenylphenalenons and diarylheptanoids. *In Vorbereitung*.
- (2) Brand, S., Hölscher, D. J., Schröder, J., Schröder, G., Svatoš, A., Schierhorn, A. & Schneider, B.: Plant polyketide synthase type III proteins from *Wachendorfia thyrsiflora*. *In Vorbereitung*.
- (3) Brand, S., Hölscher, D. J., Antonchick, A. P. & Schneider, B.: Occurrence and putative role of diarylheptanoids in the Haemodoraceae. *In Vorbereitung*.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Sequenzen wurden unter folgenden Nummern in der Datenbank des National Institute of Health (GenBank) abgelegt:

Wdf1: AY727928

Wdf2: AY739910

Wdf3: eingereicht, provisorische Nummer: bankit693909

### Vorträge:

- (1) Brand, S.: Heterologous expression of a chalcone synthase-like enzyme from *Wachendorfia thyrsiflora* (Haemodoraceae). 4. Kurt-Mothes-Doktoranden-Workshop, 3.-5.10. 2002, Jena.
- (2) Brand, S.: Vom Nutzen der chemischen Synthese und Analytik bei der Suche nach den Enzymen der Diarylheptanoidbiosynthese. 25. Fränkisch-Mitteldeutsches Naturstoffchemiker-Treffen, 28.4.2003, Jena.
- (3) Brand, S.: Chalcone synthase-related proteins from *Wachendorfia thyrsiflora*. Institute Symposium, 30.-31.1.2004, Jena.

### Poster:

Brand, S., Hölscher, D. J.: Chalcone synthase-like enzymes in *Wachendorfia thyrsiflora*. Symposium „New Directions in Plant-Insect Interaction“, 14.-15.2.2005, Jena.